

**Univerzita Karlova v Praze**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

**Dizertační práce**

Praha, 2011

MUDr. Tamara Žáčková

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Tamara Žáčková**

Využití a význam 3D ultrasonografického vyšetření v asistované reprodukci

*The role of three-dimensional ultrasonography in assisted reproduction*

**Dizertační práce**

Vedoucí závěrečné práce/školitel: Doc. MUDr. Tonko Mardešič, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Ladislav Krofta, CSc.

Praha, 2011

## Poděkování

Práce vznikla v rámci doktorského studijního programu biomedicíny na pracovišti Ústavu pro péči o matku a dítě v Praze 4-Podolí při 3. LF UK ve spolupráci s gynekologicko-porodnickým oddělením a centrem asistované reprodukce Univerzitní nemocnice v Oulu, Finsko.

Poděkování patří zejména mému školiteli doc. MUDr. Tonko Mardešičovi, CSc., a doc. MUDr. Ilkka Järvelä, Ph.D, za navržení tématu výzkumu, odborné vedení studia a všestrannou pomoc a podporu, bez jejichž účasti by práce nemohla vzniknout. Jejich kritický přístup, rychlá komunikace a konstruktivní komentáře k tématu byly pro mne nejcennější zkušeností při psaní této práce. Dále děkuji doc. MUDr. Ladislavu Kroftovi, CSc., a MUDr. Jitce Řezáčové za spolupráci, konzultace a dohled nad prováděným měřením, všem svým spolupracovníkům a odborným laborantům participujícím na biochemické analýze a zpracování jednotlivých vzorků a v neposlední řadě prof. MUDr. Juha S. Tapanainenovi, DrSc., za osvětu a umožnění realizace tohoto výzkumného záměru.

Vřelé díky za trpělivost a emocionální i materiální podporu patří mým rodičům, blízkým, přátelům a všem kolegům, kteří mně při dokončení výzkumu drželi palce.

Práce byla provedena v rámci výzkumného záměru podpořeného grantem Finské akademie a z grantu Sigrid Juselius Foundation a výsledky výzkumu byly celosvětově mnohokrát prezentovány za podpory Nadačního fondu ve spolupráci s Ústavem pro péči o matku a dítě v Praze 4-Podolí.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 09. 05. 2011

MUDr. TAMARA ŽÁČKOVÁ

Podpis

## **Identifikační záznam:**

Žáčková Tamara. Využití a význam 3D ultrasonografického vyšetření v asistované reprodukci (*The role of three-dimensional ultrasonography in assisted reproduction*). Praha 2011, 100 s. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav pro péči o matku a dítě, Praha 4-Podolí, 3. LF UK. Vedoucí závěrečné práce /školitel: doc. MUDr. Tonko Mardešič, CSc.

# OBSAH

<b>Abstrakt</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Klíčová slova</b> .....	7
<b>Key words</b> .....	8
<b>1. Úvod, definice otázky a podrobnější zdůvodnění tématu</b> .....	9
<b>2. Teoretická východiska</b> .....	13
2.1 Prostorová rekonstrukce v ultrazvukovém zobrazení 3D	
2.2 Vysvětlení principu kalkulace objemu pomocí 3D ultrazvukového zobrazení a 3D power Doppler angiografie	
2.3 Ultrazvukové vyšetření folikulární vaskularity	
2.4 Ultrazvukové zobrazení endometria	
2.5 Fyziologie a patofyziologie žlutého tělíska	
<b>3. Cíle práce a pracovní hypotézy</b> .....	27
<b>4. Použité metody</b> .....	30
4.1 Soubor pacientů a metoda 3D UZ a PDA ultrasonografického měření	
4.2 Laboratorní stanovení	
4.3 Statistická analýza dat	
<b>5. Výsledky</b> .....	39
5.1 Klinická sledování, výsledky ultrasonografických a laboratorních měření	
<b>6. Diskuze</b> .....	58
<b>7. Závěry</b> .....	69
<b>8. Seznam zkratk</b> .....	71
<b>9. Seznam použité literatury</b> .....	72
<b>10. Přílohy</b> .....	81
10.1 Seznam publikací s tematikou vztahující se k dizertační práci	
10.2 Seznam dalších publikací bez vztahu k tématu dizertace	
10.3 Seznam posterových a ústních prezentací	
10.4 Kopie publikovaných prací	

## Abstrakt

**Cíle studie:** Zhodnocení významu a vymezení nových aplikací 3D ultrasonografie v diagnostice žen zařazených do programu asistované reprodukce. Vyšetření folikulárního prokrvení ovarií metodou 3D UZ a power Doppler angiografie (PDA) ve vztahu ke kvalitě získaného oocyty bylo cílem první pilotní studie. Význam endometriálních a ovariálních parametrů pomocí 3D power Doppler ultrazvuku v predikci výsledků FET (frozenembryotransfer) cyklů jsme hodnotili v druhé práci. Cílem poslední studie bylo porovnat hormonální sekreci corpus luteum a placenty ve vztahu k 3D power Doppler UZ měřením prokrvení a objemu ovarií a corpus luteum u primigravid a multigravid po spontánní koncepci během 5.–11. týdne těhotenství. Vedlejším záměrem bylo využití těchto poznatků v problematice placentární kompetence a suplemetace těhotenství funkčně agonadálních žen.

**Metodika:** Do první prospektivní studie bylo zařazeno 17 pacientek stimulovaných v dlouhém protokolu programu IVF/ICSI. 3D UZ vyšetření a PDA ovarií a vybraného kodominantního folikulu (folikul maximálního průměru) byla prováděna v den aplikace hCG před odběrem vajíček. Byly měřeny PDA ovariální indexy VI, FI, FI, objem ovaria, objem kodominantního folikulu, stupeň perifolikulárního prokrvení a power Doppler indexy PI a RI folikulární arterie. Oocyty získané z kodominantního folikulu obou ovarií byly fertilizovány metodou ICSI a následně zvlášť sledován růst a vývoj daného embrya. V další studii jsme vyšetřovali endometriální a ovariální parametry pomocí 3D UZ PDA u 30 žen v programu FET. Vzorky krve pro hormonální analýzu P, 17-OHP, estradiolu a 3D ultrasonografická měření byly prováděny v den FET a o týden později včetně analýzy celkového hCG. V poslední studii byla porovnávána hladina sérového hCG, P, 17-OHP, estradiolu, testosteronu a PAPP-A mezi primigravidami a multigravidami v longitudinální studii 41 žen po spontánní koncepci. Dále byly měřeny objemy a prokrvení dominantních ovarií pomocí 3D PDA k identifikaci žlutého tělíska.

**Výsledky:** Ze 17 žen zařazených do studie týkající se predikce kvality oocyty 5 otěhotnělo (29,4 %) a 12 nikoliv (70,6 %). Ve skupině těhotných byl signifikantně větší počet embryí nejvyšší kvality (kvalita 1.) v den ET, signifikantně větší flow index kodominantního folikulu pravého ovaria a signifikantně častější zastoupení nejvyšší morfologické preimplantační kvality 1. a 2. embrya, která byla následně transferována ( $p = 0,029$ ;  $p = 0,020$ ). Rovněž jsme zaznamenali častější výskyt kodominantního folikulu pravého ovaria s nejvyšším stupněm perifolikulárního prokrvení ve skupině žen, které otěhotněly ( $p=0,029$ ). V další studii posuzující endometriální receptivitu byl UZ nálezn endometriální „triple line“ v den FET signifikantně častěji přítomen u žen, které následně otěhotněly. Objem a prokrvení ovarií se mezi oběma skupinami žen neodlišovaly. Během druhého měření byl rovněž signifikantně častěji přítomen UZ obraz „triple line“ u žen, které otěhotněly, a rovněž jejich corpus luteum bylo aktivnější (posuzováno podle zvýšení sérové hladiny 17-hydroxyprogesteronu a estradiolu). V poslední studii hodnotíme vliv parity na hormonální sekreci corpus luteum a placenty ve vztahu k 3D UZ měřením ovarií a corpus luteum. Zjistili jsme, že hodnoty logaritmicky transformovaných AUC (AUC log) mateřského sérového hCG, P, 17-OHP naměřené ve 5.-11. týdnu gravidity byly vyšší u primigravid než u multigravid.

**Závěry:** Zhodnocení perifolikulární vaskularity a ovariálního prokrvení pomocí 3D PDA může předpovídat získání kvalitního oocyty a následně embrya s předpokladem normálního vývoje po jeho oplození. Přítomnost UZ obrazu „triple line“ v den FET můžeme pokládat za pozitivní prediktor prosperující gravidity po provedeném přenosu rozmrazených embryí. Tato studie jako první publikuje význam detekce aktivovaného žlutého tělíska v těhotenství již v prvním týdnu po provedení FET. Rozdílnou míru funkce placenty, odrážející funkci corpus luteum, můžeme pozorovat mezi primigravidami a multigravidami již během prvních týdnů těhotenství.

## Abstract

**Objective:** Clarifying the role of 3D ultrasound and definition of new applications in the diagnosis of sterility. Assessment of perifollicular and ovarian vascularity as measured using 3D ultrasound and PDA in relation to the quality of oocytes was the aim of the first pilot study. In the second study we evaluated whether the endometrial and ovarian parameters as measured using 3D power Doppler ultrasound can predict the outcome in frozen embryo transfer (FET) cycle. To compare the luteal and placental hormone secretion in relation to power Doppler 3D ultrasound volume and vascularity measurement of dominant ovary and corpus luteum between primigravid and multigravid women during the 5th to 11th week of pregnancy with the possibility of applying relational context for the first trimester of pregnancy in functionally agonadal women.

**Methods:** In the first prospective pilot study 17 women were recruited in IVF/ICSI stimulation related to kind of stimulated protocol and cause of sterility to determine ovarian and co-dominant follicle (follicle with maximum diameter) volume, blood flow characteristics using three dimensional power Doppler ultrasound, grading system of perifollicular vascularity (Chui D.K.C. et al., 1997) and power Doppler indexes PI and RI of follicular artery. The oocyte of the co-dominant follicle from both ovaries was fertilized by ICSI and observed his embryogeny. In the next study we evaluated the endometrial and ovarian parameters as measured using 3D PDA UZ in 30 women undergoing FET. Blood samples for hormonal analysis (P, 17-OHP, E2) were collected and three-dimensional ultrasonographic examination was performed on the day of FET and repeated with analysis of the total hCG one week later. In the last study serum human chorionic gonadotropin (hCG), progesterone (P) and 17-OH progesterone (17-OHP), estradiol (E2), testosterone (T), and PAPP-A levels in the longitudinal study in 41 naturally conceived women were assessed. The volume and the vasculature of the dominant ovary were assessed using three-dimensional (3D) power Doppler ultrasonography to identify the corpus luteum.

**Results:** The IVF/ICSI cycle in the study regarding the quality of oocyte prediction were evaluated in 17 women, among which 5 were pregnant (29.4%) and 12 non-pregnant (70.6%). In the group of pregnant women, there is a significantly larger number of grade 1 embryos on transfer day, a significantly larger flow index of ovarium l. dx and there is a significant difference in the degree of morphological preimplantation quality of the first and second transferred embryos. There is a significant difference in the degree of perifollicular vascularity of co-dominant follicle in the ovarium l. dx. In the next study the endometrial “triple line” pattern was more often present in the pregnant group on the day of FET. No differences in the ovaries were observed on the day of FET. At the second visit, the triple-line pattern was still more often present in those patients who had conceived, and their corpus luteum was more active as judged by the rise in 17-OHP and estradiol levels. In the last study we compare the effect of parity on placental and luteal secretion in relation to power Doppler 3D ultrasound volume and vascularity measurement of dominant ovary and corpus luteum. During pregnancy weeks 5-11 the secretion (log-transformed area under curve-AUC log) of maternal serum hCG, P and 17-OHP were higher in primigravid than in multigravid women.

**Conclusions:** The perifollicular and ovarian vascularity assessment with 3D ultrasonography and PDA may represent a possible predictors of the outcome in assisted conception therapy. The existence of the triple-line pattern on the day of FET seems to be a prognostic sign of a prosperous outcome after FET. The dominant ovary in the pregnant group seems to be already activated one week after FET. The placental function already differs between primigravid and multigravid women during the first weeks of pregnancy, which is reflected to the corpus luteal function.



## Klíčová slova

3D transvaginální ultrasonografie (3D TVUS)  
3D power Doppler angiografie (3D PDA/  
vaskularizační index (VI)  
průtokový index (FI)  
vaskularizačně-průtokový index (VFI)  
index rezistence (RI)  
index pulsatility (PI)  
perifolikulární vaskularita  
endometriální receptivita  
corpus luteum  
placenta  
luteoplacentální shift  
fertilizace in vitro (IVF)  
intracytoplazmatická injekce spermií (ICSI)  
odběr oocytů (OPU)  
transfer rozmražených embryí (FET)  
testosteron (T)  
estradiol (E2)  
pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A)  
17-OH progesteron (17-OHP)  
progesteron (P)  
human chorionic gonadotropin (hCG)

## **Key words**

3D transvaginal ultrasonography (3D TVUS)  
3D power Doppler angiography (3D PDA)  
vascularization index (VI)  
flow index (FI)  
vascularization-flow index (VFI)  
pulsatility index (PI)  
resistance index (RI)  
perifollicular vascularity  
endometrial receptivity  
corpus luteum (CL)  
placenta  
luteoplacental shift  
frozen embryo transfer (FET)  
fertilization in vitro (IVF)  
intracytoplasmic sperm injection of eggs (ICSI)  
ovum pick up (OPU)  
frozen embryotransfer (FET)  
testosterone (T)  
estradiol (E2)  
pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A)  
17-OH progesteron (17-OHP)  
progesteron (P)  
human chorionic gonadotropin (hCG)

# 1. Úvod, definice otázky a podrobnější zdůvodnění tématu

Podmínkou úspěšné léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce je zhodnocení a výběr kvalitního oocyty. Jen takový může úspěšně fertilizovat a dát vzniknout kvalitnímu embryu. Po zavedení embrya je klíčovou jeho interakce s děložní sliznicí, kdy hovoříme o tzv. endometriální receptivitě. Selhání implantace zůstává hlavním důvodem, proč většina IVF cyklů nevede k očekávanému těhotenství. Pokud žena otěhotní, je nezbytná přítomnost správné funkce corpus luteum, tedy minimální hladina luteálních hormonů udržujících těhotenství. Proto musí být těhotenství funkčně agonadálních žen do doby, než funkci corpus luteum převzme placenta, hormonálně suplementována.

Předmětem našeho zkoumání bylo zhodnocení významu a možností využití 3D ultrasonografie v diagnostice žen zařazených do programu asistované reprodukce.

## 1.1 Asistovaná reprodukce a její současný stav

Asistovaná reprodukce je už více než třicet let staré medicínské odvětví, které se věnuje umělému oplodnění. Základní metodou asistované reprodukce (AR) je mimotělní oplodnění a přenos embrya do dělohy – **fertilizace in vitro (IVF)** a **embryo transfer (ET)**. V r. 1978 se jako první „dítě ze zkumavky“ narodila Luisa Brownová v Cambridgi. V r. 1984 se narodilo první „dítě ze zkumavky“ v Československu, což byl velký úspěch československé medicíny, protože to bylo první „dítě ze zkumavky“ ve východním bloku.

Problémy s početím má v hospodářsky rozvinutých zemích stále více párů západního světa. Specializované ambulance pro léčbu neplodnosti vyhledává v současné době 15–20 % párů. V současnosti počet dětí počatých **metodou IVF + ET** dosahuje až 4 % všech narozených. Úspěšnost tohoto léčebného programu se pohybuje okolo 30–40 % dosažených těhotenství na přenos embrya.

Mezi základní fáze léčby metodou **IVF + ET** patří **řízená hyperstimulace ovarií (COH-controlled ovarian heperstimulation)**, jejímž účelem je dosáhnout optimálního počtu zralých vajíček (oocytů). V léčebných protokolech se využívá efektu analog hypotalamického hormonu GnRh (gonadotropin relasing hormon), který svou zvýšenou afinitou k hypofyzárním receptorům způsobí nejprve tzv. flare up efekt (vzestup) a následně pokles endogenních hypofyzárních hormonů – folikulostimulačního (FSH) a luteinizačního (LH) hormonu. Jejich použitím je dosaženo kontroly nad stimulací ovarií a zabráněno předčasné ovulaci před odběrem zralých oocytů. Ke stimulaci růstu folikulů se používají lidské menopauzální gonadotropiny (hMG) – směs LH a FSH nebo samotné FSH.

V posledních letech se ke kontrole produkce endogenních hypofyzárních hormonů více používají antagonisté GnRH. Rozlišujeme několik stimulačních protokolů, které se liší dobou zahájení a délkou aplikace GnRH. Nejčastěji je v současnosti využíván dlouhý stimulační protokol s použitím agonistů GnRH a krátký protokol s použitím antagonistů GnRH. Průběh stimulace, tj. dynamika růstu folikulů je monitorována ultrazvukem a nazývá se **folikulometrií**. Vaginální sondou můžeme zobrazit ovariální folikuly od velikosti 2 mm. Vzhledem k tomu, že folikul roste rychlostí 2–3 mm za den a praská při velikosti  $22 \pm 2$  mm, můžeme poměrně dobře předpovídat jeho vývoj několik dní dopředu. Cílem této kontroly je odhadnout optimální dobu aplikace hCG (lidský choriový gonadotropin), kterým se zahájí zrání a uvolnění oocyty z folikulu, tedy časování ovulace.

Další fází je **aspirace folikulární tekutiny spojená s odběrem oocytů (Ovum pick up, OPU)**. Po aplikaci hCG je nutno do 32–36 h provést aspiraci folikulární tekutiny s oocytem. V případě nenalezení oocyty mluvíme o syndromu „prázdného folikulu“. Odběr vajíček probíhá pod kontinuální UZ kontrolou vaginální sondou. Klenbou poševní je tenkou jehlou punktován folikul a aspirována folikulární tekutina se zralým oocytem. Po odsátí folikulární tekutiny s obsaženým oocytem následuje **laboratorní část**, kdy jsou získané oocyty izolovány z folikulární tekutiny a přidány kapacitované spermie.

V případě neschopnosti spermií spontánně oplodnit vajíčko (nízký počet, nízká pohyblivost), imunologické příčiny neplodnosti, selhání oplodnění při klasické metodě IVF, při opakovaných neúspěšných pokusech umělého oplodnění, při vyšším věku, při zisku malého počtu vajíček, při užití kryokonzervovaných spermií, při užití darovaných vajíček aj. je možné provést **metodu intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI)**. Embryolog injikuje jedinou spermii do cytoplazmy zralého oocyty. Vybraná spermie je znehybněna, nasáta do mikroinjekční pipety a pomocí mikromanipulačního zařízení vpravena do oocyty.

Po úspěšné fertilizaci následuje kultivace embrya, která standardně trvá 48 h. Ve snaze přiblížit se fyziologickým podmínkám lze tuto dobu prodloužit až do 120 h po oplodnění, kdy hovoříme o **tzv. prodloužené kultivaci embryí**. Posledním krokem završujícím cyklus umělého oplodnění (IVF) je **embryotransfer** neboli zavedení embrya do dutiny děložní. Zvýšení efektivity je limitováno nízkým „implantation rate“. Proto se v minulosti transferoval do dělohy větší počet embryí, který však zvyšoval riziko vícečetné gravidity. Úspěšnost implantace embrya je ovlivněna jak **mateřskými** faktory (věk pacientky, ovariální rezerva, doba trvání neplodnosti, způsob ovariální stimulace, plazmatická hladina hypofyzárních hormonů, kvalita luteální fáze a děložní faktor neboli endometriální receptivita), **tak embryonálními faktory** (genetika, složení folikulární tekutiny obsahující plazmatické bílkoviny, proteiny transportující

steroidy [SHBP], enzymy, plazminogen, steroidní hormony, hypofyzární hormony, nesteroidní ovariální faktory či lipofilní toxické látky) a jejich vzájemnou interakcí. **Selhání implantace** zůstává hlavním důvodem, proč většina IVF cyklů nevede k očekávanému těhotenství. Schopnost identifikovat a hodnotit **endometriální receptivitu** pomocí neinvazivního ultrasonografického vyšetření by tak mohla výrazně přispět ke zvýšení úspěšnosti léčby.

Samostatný obor představuje **andrologie**, která se zabývá diagnostikou a léčbou chorob mužských reprodukčních orgánů a tedy i mužským faktorem neplodnosti. V případě nadpočetného množství embryí, výskytu ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS), nemožnosti provést transfer čerstvých embryí (ET) z důvodu např. akutní nemoci, výskytu polypu, nízké děložní sliznice či krvácení je možné embrya zamrazit a následně provést **embryotransfer rozmrazených embryí (FET neboli KET)**. Této možnosti využíváme rovněž v programu dárcovství embryí a pro uchování embryí onkologicky nemocných žen před radio- nebo chemoterapií.

## 1.2 Definice otázky a podrobnější zdůvodnění tématu

V popředí současného zájmu lékařů zabývajících se metodami asistované reprodukce je zvyšování úspěšnosti této metody, tj. zvyšování pravděpodobnosti otěhotnění. K tomu je nutné analyzovat všechny **faktory, které úspěšnost metod asistované reprodukce ovlivňují**. Základní podmínkou pro úspěšnou léčbu sterility metodami AR je bezesporu zisk kvalitních oocytů, dávající možnost vzniku kvalitního a dobře se vyvíjejícího embrya. Vývoj v léčbě sterility metodami asistované reprodukce směřuje k přenosu jediného vysoce kvalitního embrya (single embryo transfer) při zachování standardně vysoké úspěšnosti léčby. V této souvislosti v posledních letech ustupují do pozadí „standardní“ stimulační protokoly využívající vysokých dávek FSH často s vyšším počtem získaných oocytů. Na významu stále více nabývají tzv. měkké stimulační protokoly, jejichž cílem je sice menší počet rostoucích folikulů, které jsou však zdrojem vysoce kvalitních oocytů. Tento Natural/Mild IVF management (ISMAAR) vyžaduje, aby lékaři více porozuměli fyziologii folikulárního růstu a širší znalosti v problematice ultrasonografického vyšetřování.

Angiogeneze hraje klíčovou roli v nejrůznějších reprodukčních procesech ženy zahrnující jak vývoj dominantního folikulu, růst endometria a implantaci, tak formaci žlutého tělíska. Folikulární prokrvení hraje hlavní roli během růstu a vývoje folikulů (15, 13).

Nárůst v perifolikulární angiogenezi během selekce dominantního folikulu a následně vzestup hladiny LH či HCG může odrážet průtoková rychlost (peak systolic velocity, PSV) či míra perifolikulárního prokrvení (9,15,54,52). 3D zobrazení při čtyřnásobném zvětšení umožňuje zobrazit cévy folikulární stěny a identifikovat nepravidelnosti pravděpodobně odpovědné za selhání oplodnění (9). V této souvislosti **včasná identifikace vysoce kvalitních folikulů** by mohla sloužit jako jedna z cest umožňujících velmi včasnou selekci oocytů a embryí s nejvyšší vývojovou kompetencí a nadějí na úspěšnou implantaci.

Zhodnocení vaskularity a jejího vlivu na potenciální kvalitu oocytů pomocí transvaginální 3D ultrasonografie a 3D power Doppler angiografie (3D PDA) bylo **cílem naší první studie**. Selhání implantace zůstává hlavním důvodem, proč většina IVF cyklů nevede k vytouženému těhotenství. Dobré prokrvení endometria je obvykle zvažováno jako esenciální faktor úspěšné implantace. Současný pokrok v 3D TVUS a PDA umožňuje detailně vizualizovat struktury pánevních orgánů k analýze jejich objemu s nejvyšší přesností (1, 60). Z téhož důvodu je možné se domnívat, že analýza power Doppler signálu v daném objemu bude lépe odrážet celkovou vaskularizaci daného orgánu než analýza 2D zobrazení či měření průtokové rychlosti jedné cévy. Posouzení významu neinvazivního 3D power Doppler ultrasonografického měření endometriálních a ovariálních parametrů v predikci výsledků FET cyklů bylo **předmětem zkoumání naší druhé studie**.

Informace o průběhu a vztahu hladin hCG, estrogeneru a progesteronu jsou v časném těhotenství zásadní pro pochopení jejich významu pro normální vývoj těhotenství a fetoplacentární jednotky. Pozitivní korelace mezi hladinou progesteronu, mírou prokrvení a hodnotou objemu corpus luteum bylo pozorováno mnoha autory (35, 36, 50, 57). Zhodnotit vztah hormonální sekrece corpus luteum a placenty ve vztahu k 3D power Doppler ultrasonografickým měřením prokrvení a objemu ovarií a corpus lutea u primigravid a multigravid po spontánní koncepci během 5.–11. týdne těhotenství bylo **cílem naší poslední studie**. Znalost hormonálních hladin steroidů produkovaných CL a následně placentou v 5.–11. týdnu těhotenství po spontánní koncepci může s přesností určit dávkování a nezbytnou délku hormonální suplementace v raném těhotenství u funkčně agonadálních žen.

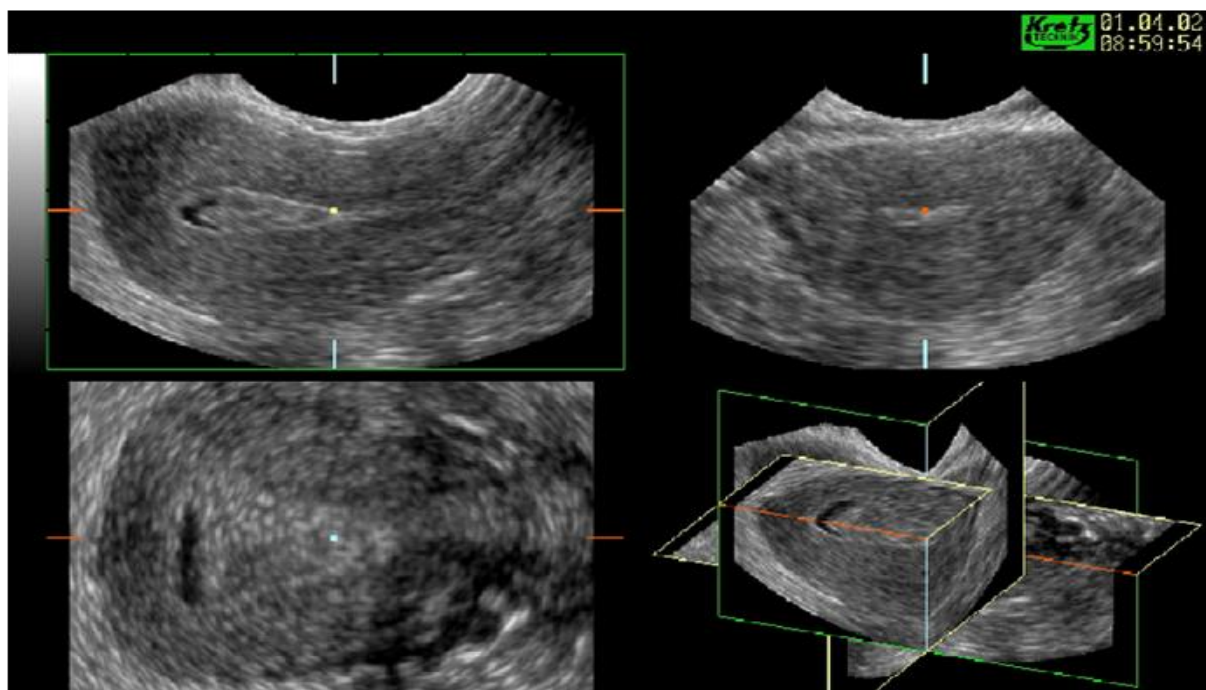
## 2. Teoretická východiska

### 2.1 Prostorová rekonstrukce v ultrazvukovém zobrazení 3D

Využití tří- (3D) a čtyřdimenzionální (4D) ultrasonografie v diagnostickém algoritmu u párů s poruchou plodnosti předcházelo rozvoj těchto technologií v rámci gynekologie a porodnictví. Základním předpokladem pro běžné zavedení této zobrazovací techniky byl rychlý rozvoj počítačových technologií. První pokusy s prostorovým ultrazvukovým zobrazením lze zaznamenat v 70. letech minulého století. Tehdy získání jediného prostorového obrázku analýzou jediného volumu dat vyžadovalo počítačové zpracování v délce 24 h a počítačový hardware vyplnil celou místnost (79). Pro rozvoj 3D ultrasonografie a její zavedení do běžné klinické praxe sehrály stěžejní úlohu dvě řešení elektroinženýringu. Prvním je externí elektromagnetický senzor polohy, který vylučuje nepřesnost pohybu sondy vyšetřujícím v případě, že je využíván tzv. free hand 3D. Jedná se o nejjednodušší a zároveň i nejstarší způsob 3D zobrazení, kdy ultrazvukovou sondou pohybuje sonografista a přístroj ukládá do paměti jednotlivé snímky z 2D řezů. Druhým základním technickým zdokonalením bylo motorizované snímání (akvizice) speciální 3D sondou. U těchto systémů sonda obsahuje vlastní mechanismus, který automaticky pohybuje zdrojem ultrazvukového vlnění a systém následně ukládá jednotlivé 2D obrazy. První typ motorizované sondy byl vyvinut v roce 1974 a poprvé byly tyto sondy zavedeny do klinické praxe v roce 1987 (26). Tyto konstrukce se za poslední roky zdokonalily tak, že mohou pohyb vykonávat velice přesně a rychle. Výsledkem 3D snímání je prostorový objem dat (dataset), který je uložen v paměti přístroje a je schopen procesem označovaným jako „rendering“ zobrazit prostřednictvím stínování na plošném stínítku prostorový model. Moderní 3D sondy, a zvláště pak sondy matrixové, dokážou sejmout až několik desítek objemů za sekundu a ve spojení s výkonnou počítačovou částí počítače jsou schopny vygenerovat prostorový model a sledovat jeho pohyb v reálném čase (live 3D/4D).

**3D TVUS** (Three-dimensional Transvaginal Sonography) zaujímá v oboru gynekologie a reprodukční medicíny relativně novou zobrazovací metodu. Umožňuje vyšetření ve všech třech rovinách, a tedy nejpřesněji hodnotí objemové parametry. Dovoluje simultánní zhodnocení individuálních sekčních rovin závislých částečně na poli našeho zájmu měření. Unikátně zobrazuje koronární rovinu kolmou k ose snímače napomáhající identifikaci povrchových nerovností, které mohou být zahrnuty při měření objemu. Další výhodou 3D ultrazvukového zobrazení je autory zmiňovaná možnost pomocí digitálních

technologii shromažďovat velká množství dat bez jakékoliv ztráty informací, která mohou být následně analyzována a přehodnocena. To umožňuje redukci času potřebného k vyšetření. Hovoříme o tzv. telemedicině a virtual real time consultation (61). Využití 3D TVUS na polí asistované reprodukce ve folikulometrii je všeobecně považováno za přesnější v predikci zralých folikulů. 3D ultrasonografie se dále uplatňuje v diagnostice děložních anomálií, zhodnocení intrauterinních patologií, průchodnosti vejcovodů a hodnocení polycystických ovarii. Současný pokrok v 3D TVUS umožňuje měřením endometriálního objemu, echogenicity a endometriálního prokrvení posoudit receptivitu endometria. Optimálně naladěné barevné dopplerovské zobrazení dává kvalitní obraz vaskularizace jednotlivých orgánů. Zastánci 3D TVUS zdůrazňují ve srovnání s 2D UZ především větší přesnost měření, lepší informace o krevním průtoku a anatomii daného objektu měření, zlepšení zhodnocení komplexnosti anatomických odchylek, vyšší specifitu týkající se potvrzení normality a standardizaci sonografického vyšetřování. Nicméně mnoho autorů zůstává nepřesvědčených o údajných výhodách 3D ultrazvukového zobrazení v oblasti gynekologické diagnostiky, což souvisí s vyššími pořizovacími náklady přístroje, delší vyšetřovací dobou a potřebnými zkušenostmi sonografisty.



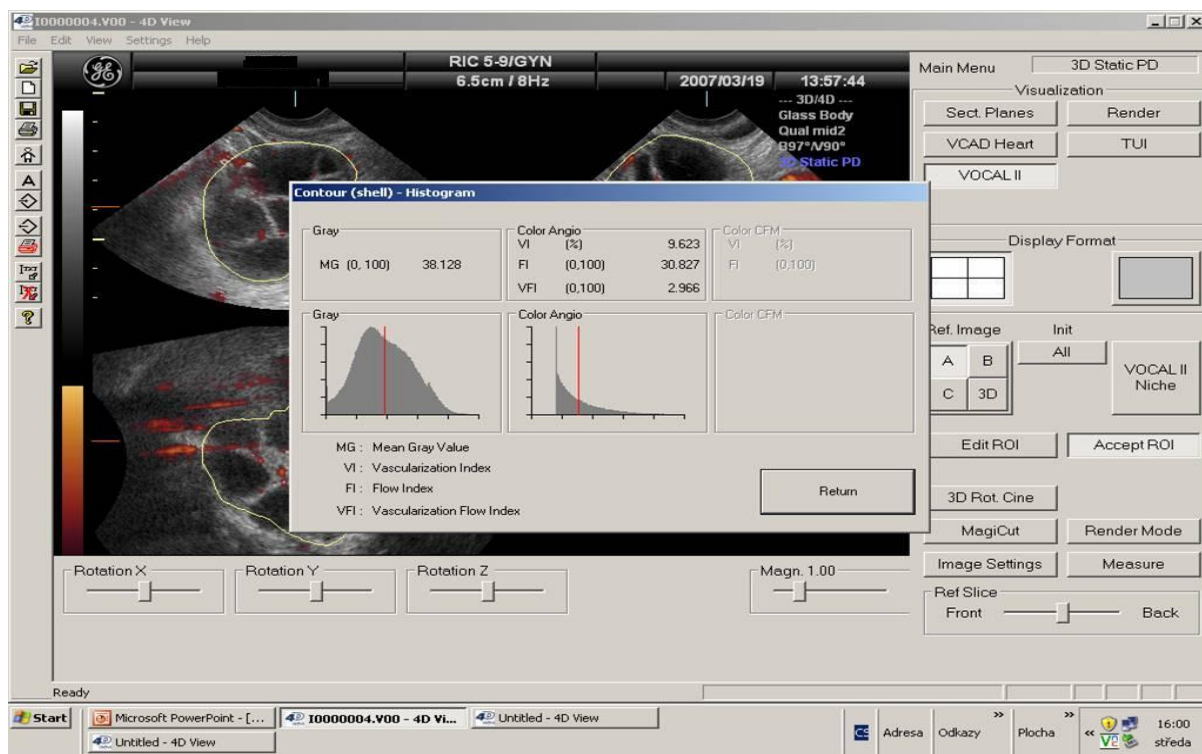
**Obr. 1.** Použijeme-li tzv. multiplanární zobrazení, získáme 3 roviny: A (vlevo nahoře) sagitální, B příčnou (vpravo nahoře) a C (vlevo dole) frontální – v anglosaské literatuře tyto roviny zvané longitudinální, transverzální a koronální. Čistě mediální a frontální rovinu získáme natočením ve všech třech osových pohledech. Pohled z frontální roviny (C) jasně dokumentuje normální konturu dutiny děložní a její trojúhelníkovitý tvar.



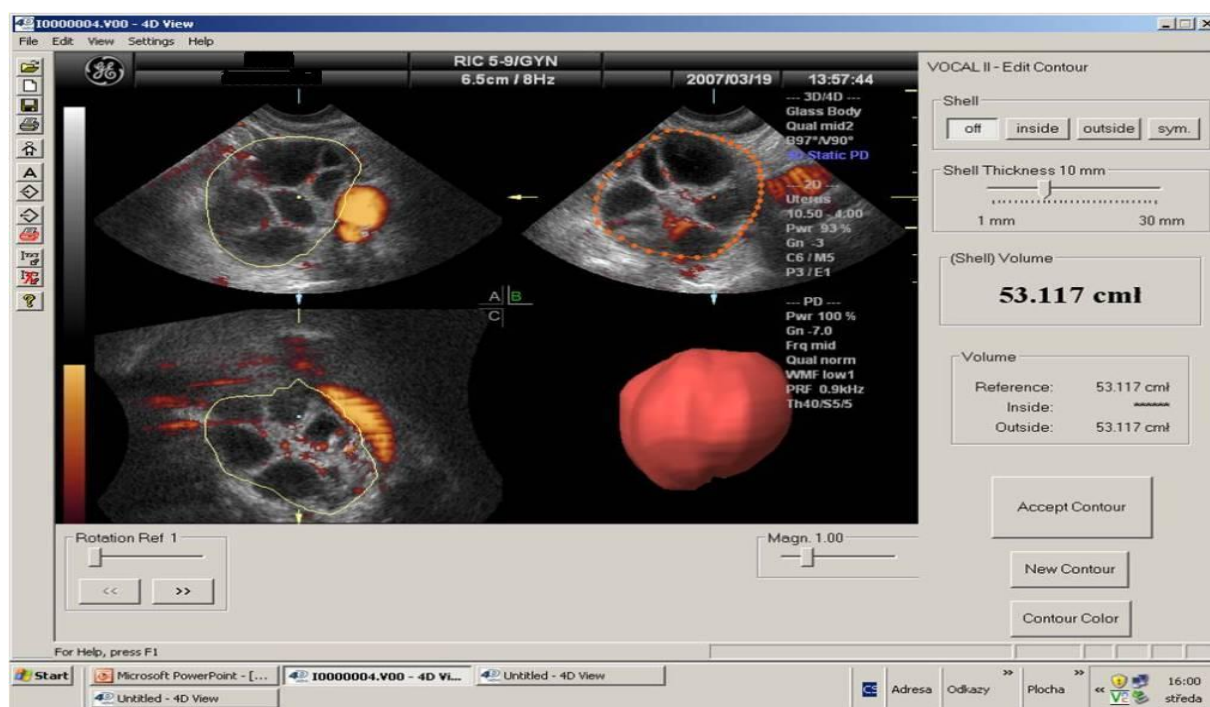
### 2.1.2 Vysvětlení principu kalkulace objemu pomocí 3D ultrazvukového zobrazení a 3D power Doppler angiografie

Pro kalkulaci objemu ze záznamu prostorového objemu dat 3D ultrasonografického měření se používají dvě základní metody: **konvenční „full planar“ obrysová metoda** a **rotační** v současnosti více používaná **metoda programu VOCAL (Virtual Organ Computer Aided Analysis)** (Obr. 2, 3, 5, 6, 7). Obě techniky zahrnují manuální náčrt objektu v tzv. multiplanárním zobrazení, ukazujícím tři na sebe kolmé roviny měření (Obr. 1). Obrysová metoda kalkulace objemu je založena na zobrazení série řezů jak v transverzální, tak v koronální rovině, přičemž obrysová kontura je vedena v jiné rovině. Vzdálenosti jednotlivých řezů odráží stupeň změn v obrysu daného povrchu objektu měření.

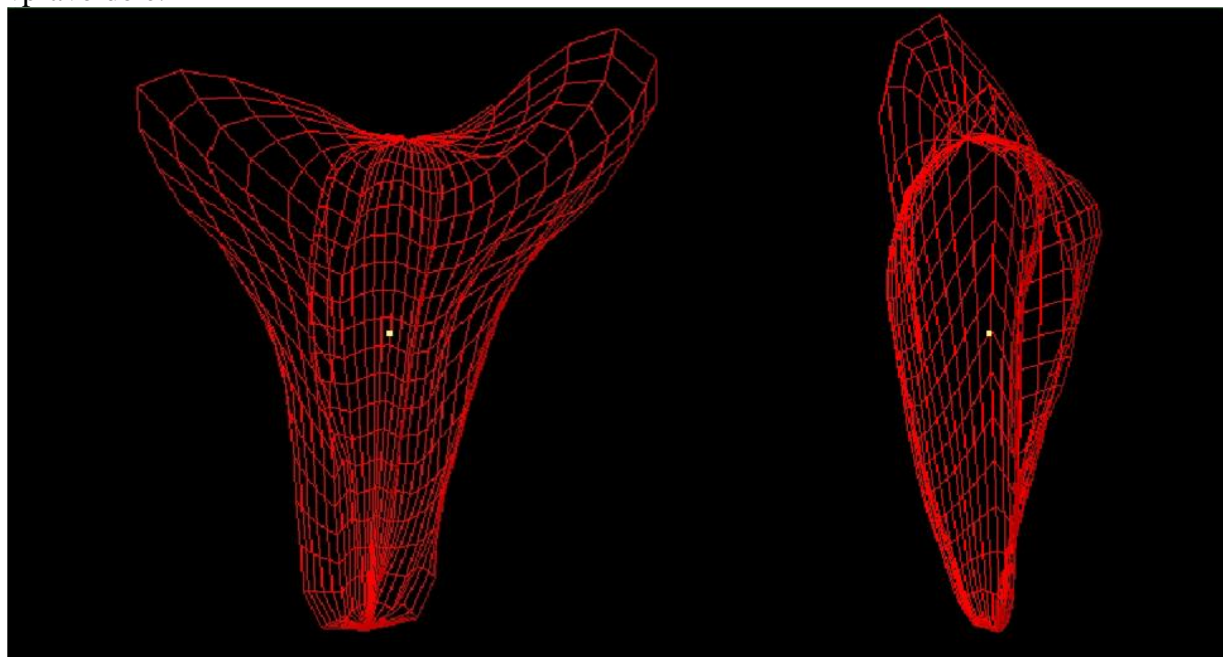
Rotační technika kalkulace objemu zobrazuje daný objekt při rotaci o  $180^\circ$  okolo centrální osy definované dvěma kalipery. Počet rovin potřebný ke kalkulaci objemu je určen počtem rotačních kroků, např. při rotačních krocích každých  $15^\circ$  či  $30^\circ$  v longitudinální či koronální rovině. Výhodou rotační techniky VOCAL je usnadnění zhodnocení krevního toku pomocí kvantifikace power Doppler signálu jak v definovaném objemu zájmu měření, tak v okolní tkáni díky aplikaci paralelních vrstev k původní definované povrchové kontuře. Objekt měření může být vyšetřen v jedné z několika rozdílných zobrazujících se možnostech za účelem maximalizace dostupné informace a zlepšení prostorového vidění. Těchto výhod využívá tzv. **3D power Doppler angiografie (PDA)**, která zavádí indexy vypočtené při využití histogramu – **VI, FI, VFI** a umožňuje rozšířené hodnocení děložní, endometriální a ovariální **vaskularity**. Při výpočtu indexů v zobrazovacím programu VOCAL v 3D UZ, který hodnotí krevní tok v celém orgánu, představuje **vascularization index (VI)** stupeň prokrvení vyjádřený množstvím barevných voxelů v definovaném objemu. Prezентuje počet cév zásobujících orgán a bývá vyjádřený procentuálně. **Flow index (FI)** udává průměrnou intenzitu krevního toku v definovaném objemu a je vyjádřený v celých číslech 0–100. **Vascularization-flow index (VFI)** reprezentuje kombinaci dvou předešlých indexů a je vyjádřen rovněž v celých číslech 0–100. Byl stanoven **exaktní vztah těchto indexů ke skutečnému průtoku a vaskularitě in vivo**. Nicméně byly shledány jisté individuální rozdílnosti naznačující subjektivní roli tohoto měření při kategorizaci rozdílností určitých skupin pacientů při měření jedním a více sonografisty (33).



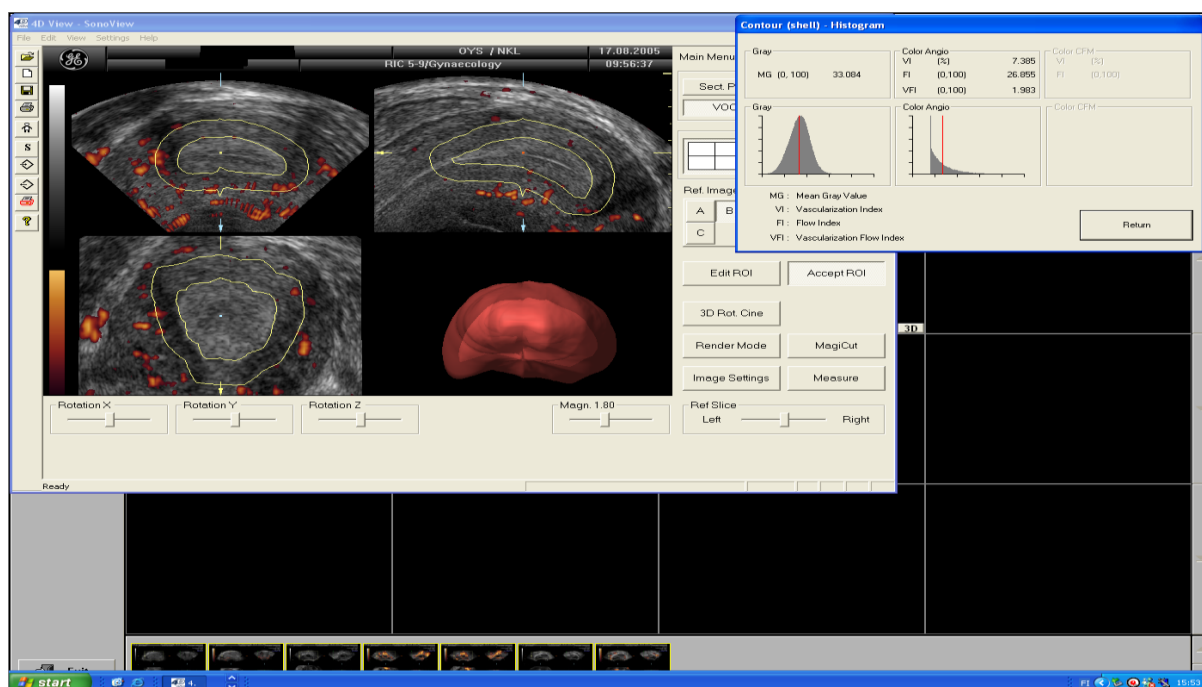
**Obr. 2.** Zhodnocení ovariální vaskularity pomocí 3D power Doppler: pro výpočet **VI**, **FI**, **VFI** bylo využito zobrazovacího programu VOCAL, hodnotícího jak objemové parametry, tak krevní tok skrz cílový objem za užití barevného histogramu. Všechny hodnoty jsou udávány jako průměr ze tří standardně prováděných měření. Dominantní folikul byl stanoven jako folikul s maximální střední hodnotou folikulárního průměru (MD). Folikulární objem byl určen podle vzorce:  $FV(ml) = 4,1888 \times (MD/2 \text{ (cm)})^3$ .



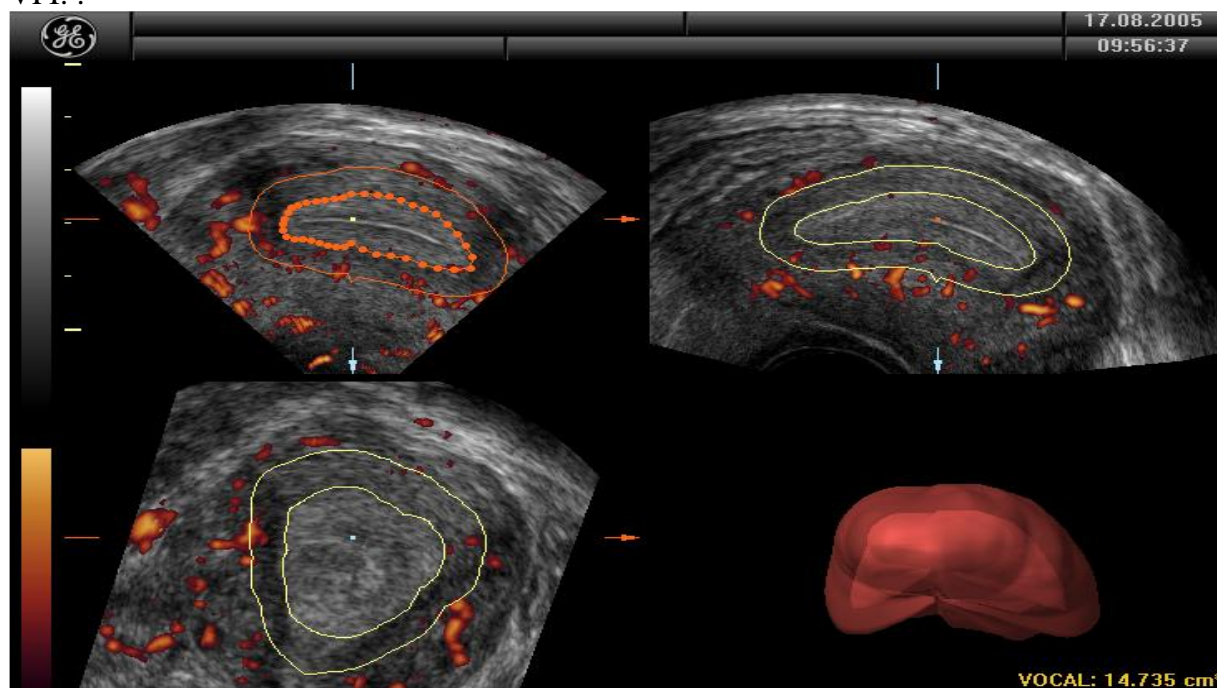
**Obr. 3.** Počítačová rekonstrukce pro výpočet celkového ovariálního objemu při využití manuálního modu v programu VOCAL, obrysy rozdílných ovariálních řezů byly zhodnoceny při rotačních krocích každých 15 st. v longitudinální rovině. Výsledný 3D model je zobrazen vpravo dole.



**Obr. 4.** 3D ultrasonografický „drátkový“ model endometria. Pokud je použito VOCAL programu ke kalkulaci objemu, 3D model endometria je tvořen při užití rotace a prohlížení v jeho přirozené orientační rovině. V tomto modelu pohled z koronální roviny zřetelně patrný nalevo demonstruje fundální defekt arcuátní dělohy, zatímco skutečná antelexe dělohy může být lépe zhodnocena z bočního pohledu vpravo.



**Obr. 5.** Vymezení **objemu subendometriální oblasti** při užití počítačové 3D rekonstrukce „plášťového“ zobrazení. V tomto případě byla oblast subendometria zvolena na hranici 5 mm. Zobrazení vaskularizace subendometria pomocí 3D – power Doppler angiografie. VI, FI a VFI. .



**Obr. 6.** Zobrazení **subendometriálního objemu** pomocí rotační metody programu VOCAL ve třech na sebe kolmých rovinách. Horní vlevo reprezentuje zobrazení v longitudinální rovině, horní vpravo zobrazení v transverzální rovině a dolní vlevo zobrazení v rovině koronální.

### 2.1.3 Ultrazvukové vyšetření folikulární vaskularity

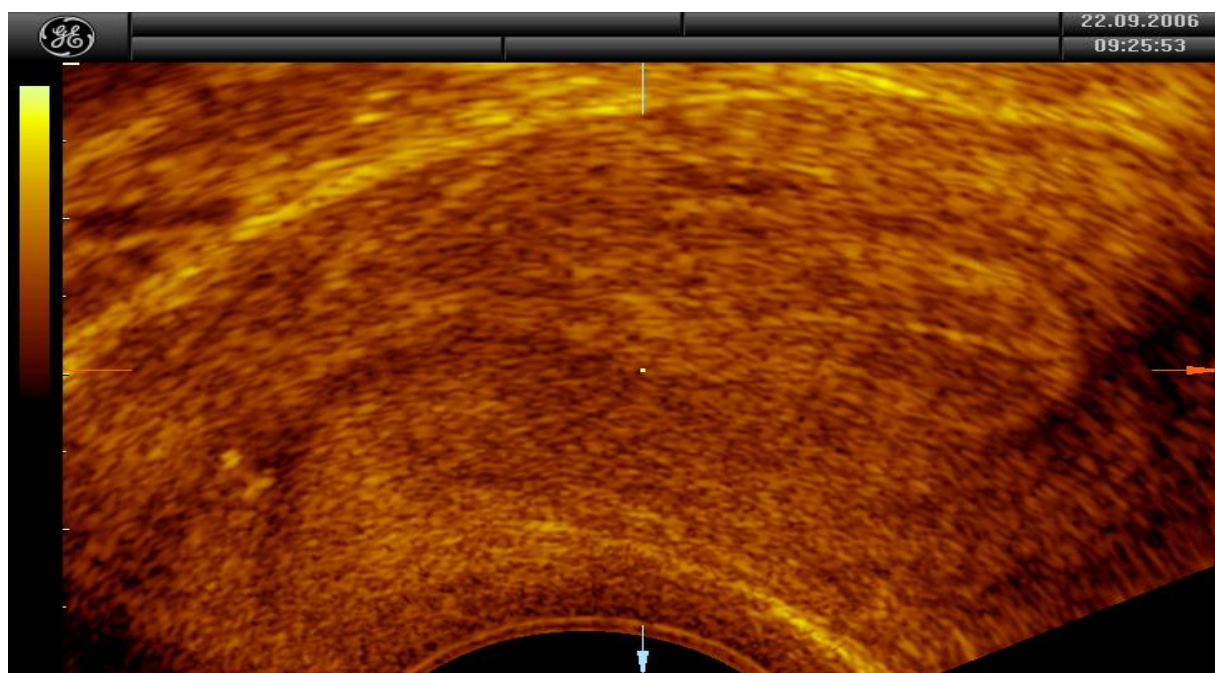
V 90. letech minulého století byla pozornost soustředěna na vlastní vyšetření prokrvení dominantního folikulu. Popisují se regionální změny prokrvení folikulu během ovulace a tyto změny jsou dávány do souvislosti s jeho zráním. Bourne udává nejvyšší index rezistence (RI) první den menstruačního cyklu a nejnižší naopak v den LH (luteinizační hormon) peaku. Hodnoty RI začínají klesat 2 dny před ovulací a nejnižších hodnot dosahují v době ovulace ( $0,44 \pm 0,04$ ) (7). Změny perifolikulární vaskularity využívající power Doppler analýzu na úrovni jednoho folikulu popisují někteří autoři podle procenta kolaterálního prokrvení a rozdělují do čtyř stupňů (15). V nativním cyklu v pozdní folikulární fázi stoupá ovariální průtok krve ve vaječníku obsahujícím dominantní folikul. Po ovulaci se postupně zvyšuje průtok corpus luteum. Již od počátku 90. let je snahou objektivizovat význam cévního zásobení ovarií a následně folikulu na kvalitu intrafolikulárního prostředí a získaných vajíček. Někteří autoři zaznamenali, že **z oocytů vysoce vaskularizovaných folikulů byla získána kvalitní embrya, která následně úspěšně implantovala** a vedla k pokračujícímu těhotenství (54, 62, 84, 9, 13). Nicméně jiní autoři (39, 59) tento závěr nepotvrdili a role power dopplerovského měření perifolikulární vaskularity v selekci oocytů v IVF cyklech zůstává nadále otevřená pro další výzkum. Je důležité poznamenat, že u převážné většiny folikulů ( $> 65\%$ ) v IVF cyklech je popisována dobrá vaskularizace a rovněž dobře vaskularizované folikuly jsou obecně větší. Je tedy nejasné, zda samotné určení velikosti folikulu nebo více času zabírající měření prokrvení folikulu budou lepšími a dostačujícími prediktory úspěšnosti cyklu (93). Relativní novinkou při vyšetřování folikulární a ovariální vaskularity je vyšetření **tzv. 3D power Doppler angiografie**, která zavádí indexy vypočtené při využití barevného histogramu – VI, FI, VFI a umožňuje tak kvantifikovat ovariální vaskularitu v cílovém objemu (**Obr. 2**). Využívá počítačové rekonstrukce pro výpočet celkového ovariálního objemu v zobrazení v již zmiňovaném 3D UZ programu **VOCAL** (Virtual Organ Computer Aided Analysis Program) za užití manuálního modu (**Obr. 3**). Obrisy rozdílných ovariálních řezů jsou pak zhotoveny při různých rotačních krocích (např. každých 15 stupňů v longitudinální rovině), umožňující výpočet indexů v zobrazovacím programu VOCAL, hodnotící krevní tok skrz celý orgán. Vyšší hodnoty VI, VFI, FI byly naměřeny např. u pacientů s PCO, kde naznačují excesivní odpověď na stimulaci gonadotropiny.

## 2.1.4 Ultrazvukové zobrazení endometria

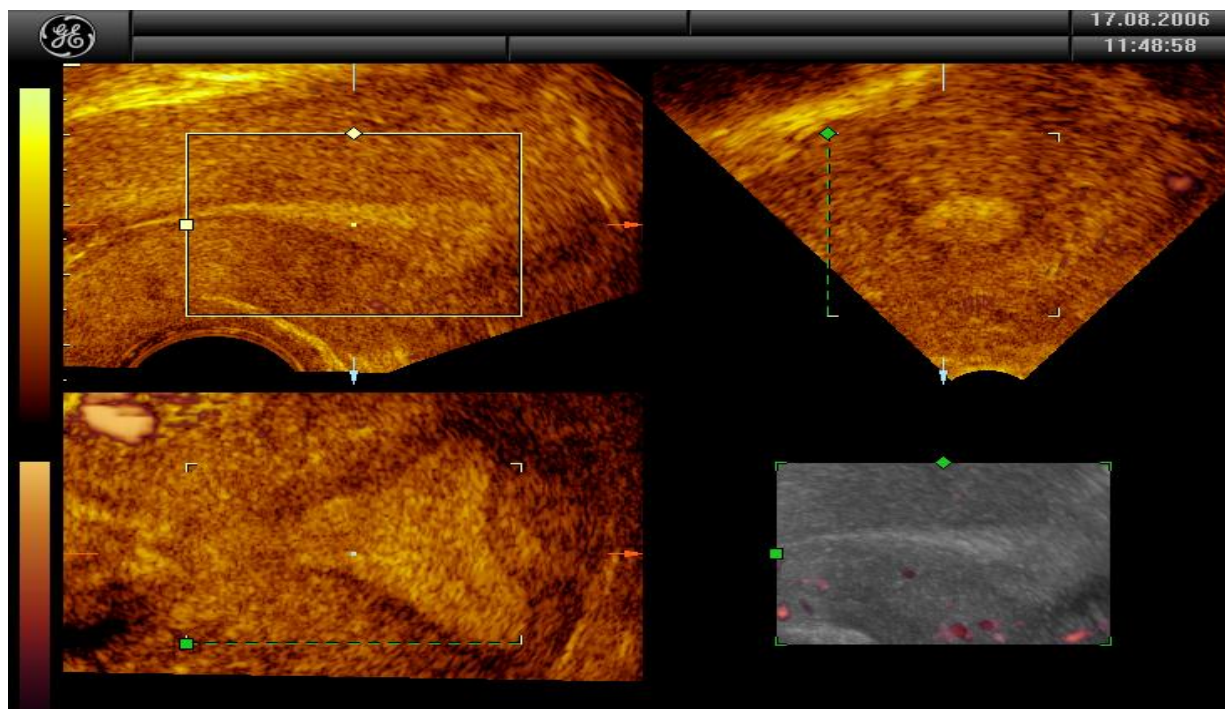
Ultrazvukové zhodnocení endometria v diagnóze sterility zasluhuje pozornost zejména z hlediska určení faktorů ovlivňujících implantaci, tedy zhodnocení děložní receptivity. Nesmírnou výhodou je jeho neinvazivnost, nenáročnost a relativně dobrá dostupnost. Jiné bioptické metody naopak hodnotí jak histologickou, tak molekulární úroveň, ale nemohou být prováděny během cyklu, ve kterém chce žena otěhotnět. O **endometriální receptivitě** mluvíme jako o časovém úseku, kdy endometriální epitel nabývá funkčních, přechodných změn závislých na produkci steroidů umožňujících implantaci blastocytu. K tomu dochází v době mezi 22.–25. dnem cyklu (7.–10. den po ovulaci), kdy mluvíme o tzv. „implantation windows“ (47). Během proliferační fáze cyklu je endometrium nejprve nízké (tzv. single line), hyperechogenní ve vztahu k vnitřní vrstvě myometria (funkční zóna). V 5. dni menstruačního cyklu nabývá výšky 1–4 mm. Poté sliznice roste a začíná se tvořit funkční edematózní vrstva. V pozdní proliferační fázi (periovulační fáze) je endometrium tvořeno trojvrstevnou linií „**triple line**“ o výšce mezi 6 až 10 mm, složenou ze zevní tenčí hyperechogenní vrstvy odpovídající vnitřní vrstvě endometria s hlenem a glykogenem, která přechází do hypoechogenní vrstvy odpovídající edému žlázek funkční vrstvy endometria (zona functionalis) a centrální hyperechogenní linií vzniklou odrazem ultrazvukových vln od hlenu. Po ovulaci nabývá pod vlivem progesteronu iso- až hyperechogenního vzhledu o výšce 7 až 14 mm. Sledujeme-li výšku endometria, ve stimulovaných cyklech gonadotropiny může endometrium dosahovat mírně větší výšky oproti nativnímu cyklu, která koreluje s hladinou sérového estradiolu. Falešně mohou zvyšovat výšku endometria nálezy submukozních myomů či polypů, naopak nižší endometrium můžeme naměřit při diagnóze intrauterinních adhezí (Ashermanova syndromu), po expozici diethylstilbestrolu (DES), ale i po stimulaci antiestrogeny. Mezi faktory negativně ovlivňující implantaci embrya tedy řadíme jak výskyt submukozních myomů, větších endometriálních polypů, adenomyozy, vaskulárních abnormalit, intrakavitárních adhezí, endometriálních kalcifikací, výskyt hydrosalpingu či vrozených vývojových děložních vad, přítomnost intrakavitární tekutiny včetně příliš malého chudě prokrveného žlutého tělíska ovarií (36, 9). Selhání implantace embrya zůstává v léčbě sterility stálým problémem (42, 47). Studie hodnotící **endometriální receptivitu** a ultrasonograficky vyšetřitelné prediktivní parametry úspěšné implantace embryí směřují pozornost zejména na výšku, strukturu a charakter endometria, endometriální echogenicitu, objem a endometriální a subendometriální cévní prokrvení (34, 38). Ve shodě s výsledky naší prospektivní studie nebyly prokázány rozdíly ve skupině těhotných a netěhotných žen první den po nástupu peaku LH v cyklech s přenosem rozmrazených embryí (FET)



při měření těchto parametrů: výška endometria, endometriální objem, charakter endometria, uterinní indexy pulzatility (PI) a indexy rezistence (RI), endometriální a subendometriální power Doppler indexy, tedy VI, FI a VFI (55, 94). Výška, objem endometria a index pulzatility (PI) uterinních arterií jsou nyní považovány za méně důležité parametry v hodnocení endometriální receptivity než morfologie endometria (triple line) a prokrvení subendometria. Současný pokrok v **3D TVUS** umožňuje s mnohem větší přesností detailně vyšetřit a vizualizovat pánevní orgánové struktury pro analýzu jejich objemu. 3D power Doppler ultrasonografie může zhodnotit jak arteriální, tak venózní cirkulaci a následně ji objektivizovat pomocí počítačové analýzy (**Obr. 4**). Tyto výhody umožňují **3D power Doppler angiografií** simultánně hodnotit jak endometriální objem, tak prokrvení (**Obr. 5, 6**). Cévní struktury mohou v tomto pojetí obrazu fungovat i jako kontrast vzhledem k okolí (49). Vyšetřovaný orgán tak můžeme dobře zobrazit, byť by v něm chybělo jinak nutné imerzní prostředí.



**Obr. 7.** UZ zobrazení endometriálního „triple line“ hodnocené v longitudinálním řezu při endovaginálním vyšetření s typickými třemi hyperechogenními liniemi na konci proliferativní fáze.



**Obr. 8.** Příklad homoechogenního typu endometria.



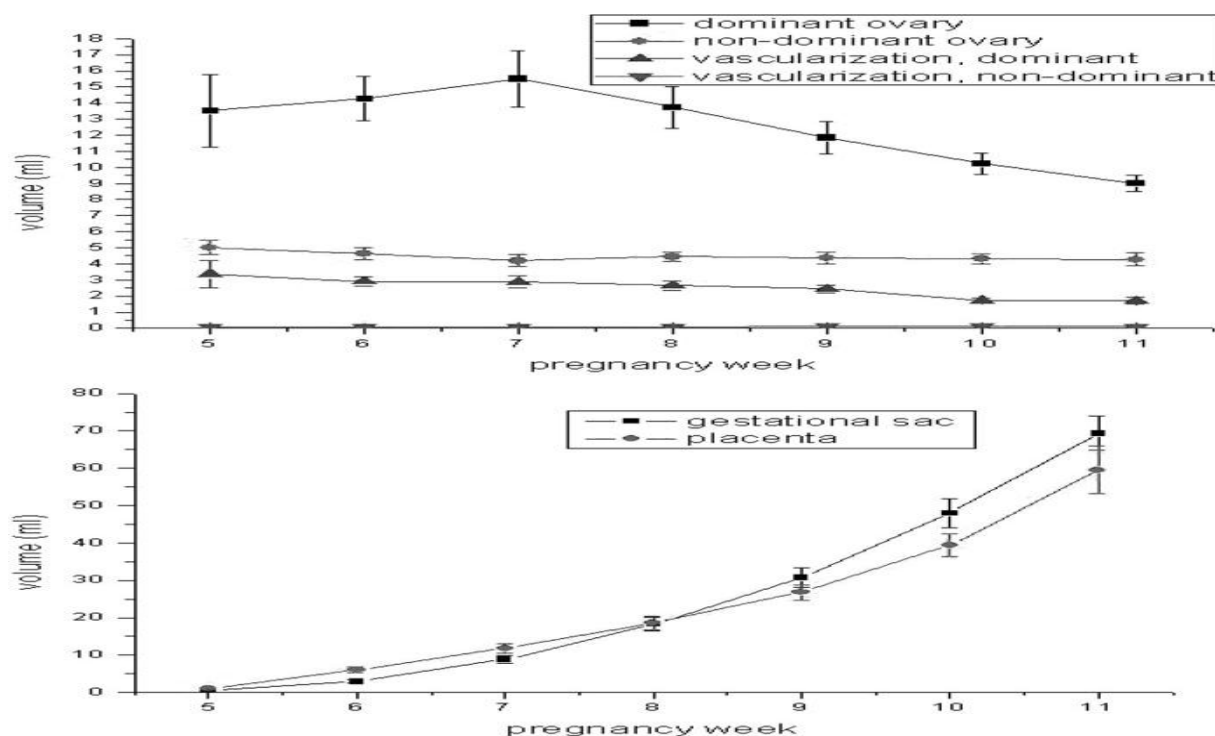
## 2.1.5 Fyziologie a patofyziologie žlutého tělíska

**Corpus luteum (CL)** je endokrinní žláza s omezenou dobou životnosti (pokud žena neotěhotní), vyvíjející se po ovulaci z prasklého folikulu během luteální fáze. CL představuje významný zdroj sekrece steroidů, zejména progesteronu, který je důležitý pro určení cyklicity menstruačního cyklu, endometriální receptivitu a hraje klíčovou roli v udržování časného těhotenství (17). Corpus luteum tvoří jednak steroidogenní buňky (theka granuloza luteinní buňky, cca 30 % objemu) a nesteroidogenní buňky (endoteliální buňky, buňky imunitního systému a fibroblasty). Oba typy buněk hrají klíčovou roli při biosyntéze steroidů. Bazální produkci progesteronu pokrývají více granuloza luteinní buňky, obsahující aromatazu. Při vystavení theka luteinních buněk hCG tyto buňky zvýší svou steroidní sekreční aktivitu. Pro biosyntézu progesteronu je potřeba dostatek LDL cholesterolu jako prekurzoru, který je pod vlivem stimulace gonadotropiny translokován z vnější mitochondriální membrány k vnitřní, kde je lokalizován komplex P450scc. Klíčovou roli v tomto dodání cholesterolu k cytochromu P450scc představuje StAR (steroidogenic acute regulatory protein), který je ve vysoké koncentraci obsažen v theka luteinních buňkách schopných syntetizovat z cholesterolu androgeny (18). V časně a střední luteální fázi je tak exprese transkriptů StAR a proteinů produkovaných corpus luteum nejvyšší a pozitivně koreluje s koncentrací progesteronu.

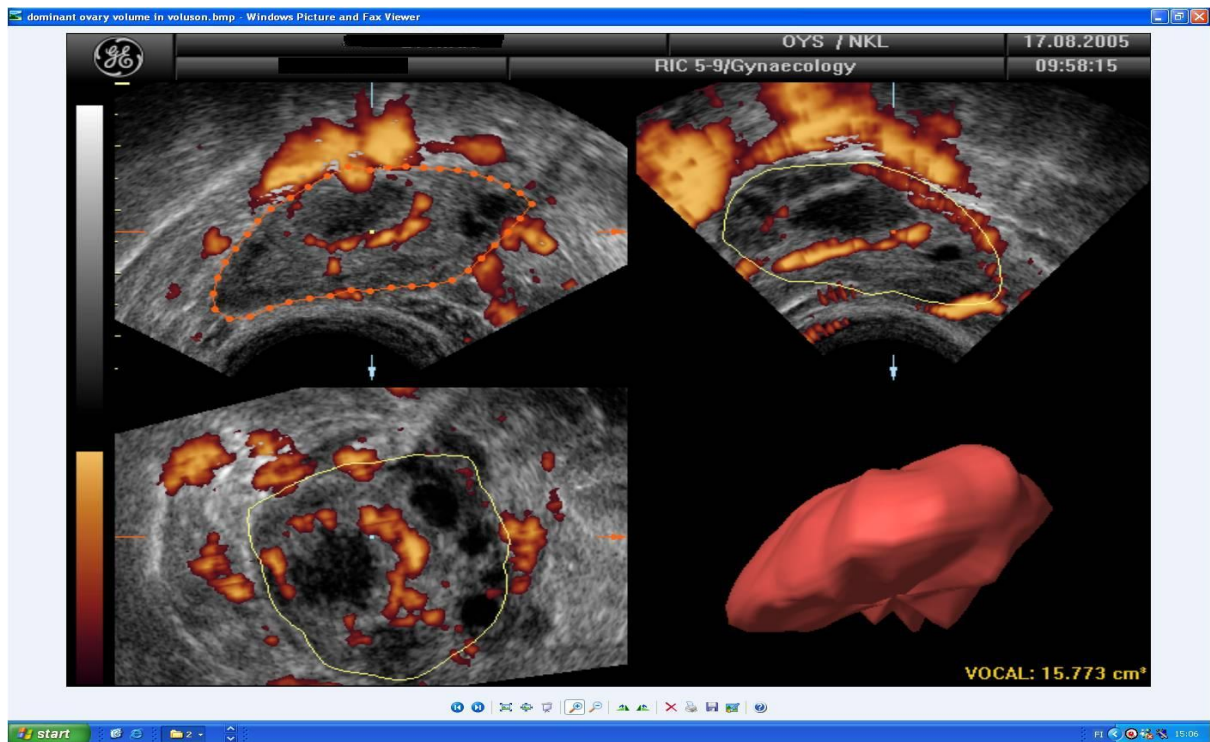
Během těhotenství trofoblast produkuje hCG, které corpus luteum „zachrání“ před involucí a doba jeho života se prodlouží na cca 12 týdnů. Pozitivní hladinu sérového hCG můžeme detekovat v době implantace (8. den po ovulaci) a jeho hladina poté progresivně během prvních 12 týdnů těhotenství stoupá. Sekrece steroidů CL graviditatis postupně klesá a je postupně přebírána placentou (tyto sekreční křivky se kříží). V okamžiku, kdy graviditu plně zabezpečí placentární sekrece hormonů, můžeme hovořit o plné placentární kompetenci (**luteoplacentární shift**). Klasické experimenty publikoval v 80. letech Csapo (11). Odstranění corpus luteum u 12 žen těhotných (gestační stáří 42–74 dnů) vedlo k potratu u 7 z nich (gestační stáří  $49 \pm 2$ ), 5 těhotenství pokračovalo ( $61 \pm 4$  dny). Odstranění CL graviditatis před dokončeným 7. týdnem těhotenství vedlo k potratu u všech těhotných.

Aktivitu CL můžeme hodnotit jednak zhodnocením CL vaskularity pomocí 3D UZ PDA, umožňující kvantifikaci celkového objemu a vaskularizovaného objemu dominantního ovaria s přítomným CL a jednak zhodnocením systémové hladiny luteálních steroidů. Pozitivní korelace mezi hladinou progesteronu, mírou prokrvení a hodnotou objemu CL byly pozorovány mnoha autory (35,36,50,57). Angiogeneze CL je regulována lokální sekrecí růstových faktorů, jako např. VEGF (29,75). Expres a syntéza těchto faktorů zodpovědných za

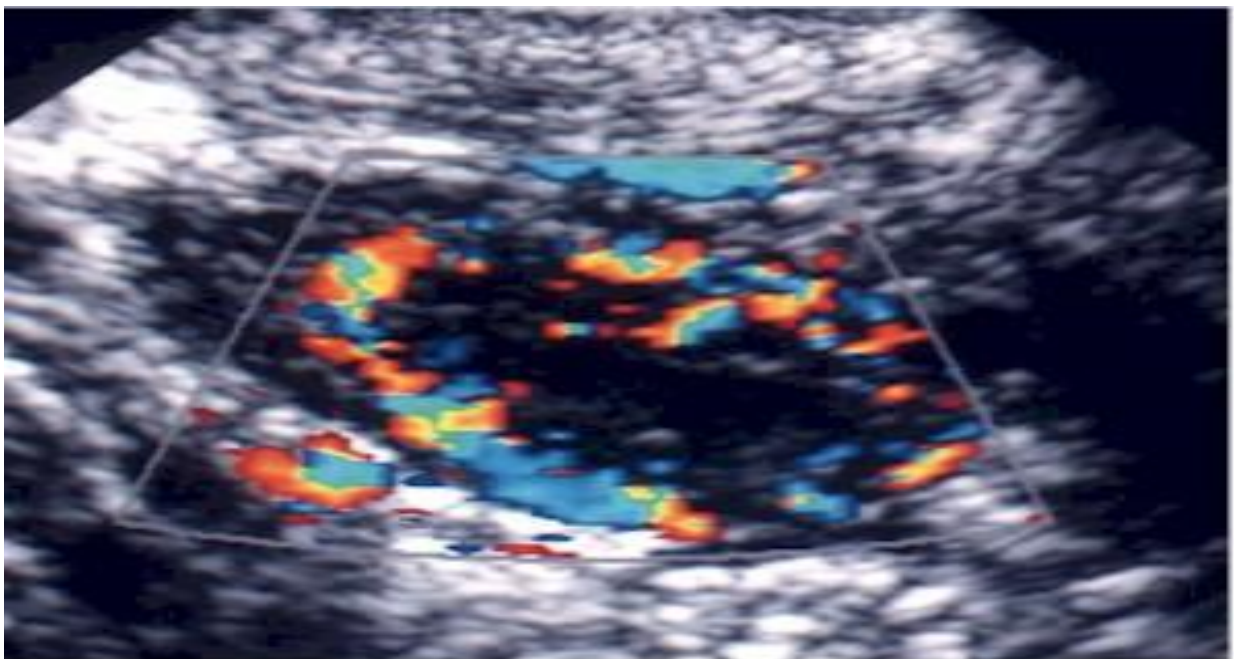
angiogenezi CL je regulována luteinizačním hormonem (LH) a chorionic gonadotropinem (hCG) (22). Očekávalo by se, že s rostoucí koncentrací hCG od 8.–9. týdne těhotenství bude růst také objem CL a jeho prokrvení, vedoucí k nárůstu systémové hladiny progesteronu (82). Nicméně bylo změřeno, že navzdory rostoucí hladině hCG aktivita CL po 5. týdnu těhotenství klesá. Spojitost mezi CL hormonální sekrecí a jeho vaskularitou byla potvrzena výsledkem úzké korelace mezi poklesem prokrvení CL a poklesem sekrece 17-OHP. Maximální objem dominantního ovaria (ovarium s přítomným CL) byl naměřen v 7. týdnu těhotenství a poté kontinuálně klesal do 11. týdnu gravidity. Největší prokrvení dominantního ovaria (volum x vascularization index, tedy vaskularita) bylo naměřeno v 5. týdnu těhotenství, poté kontinuálně klesalo až do 11. týdne gravidity. Dominantní ovarium mělo v každém okamžiku měření větší objem a prokrvení než nedominantní ovarium (**Obr. 9**). Tento fakt naznačuje, že změny objemu a prokrvení dominantního ovaria jsou dány změnami nastávajícími v CL. Výsledky studií tedy deklarují, že stoupající hladina hCG během časného těhotenství nesouvisí s neoangiogenezí či prokrvením CL a primárním důvodem poklesu hormonální sekrece CL je jeho klesající prokrvení(35). Tyto závěry potvrzují **dočasnou schopnost CL** zvyšovat sekreci steroidů pod vlivem hCG (82).



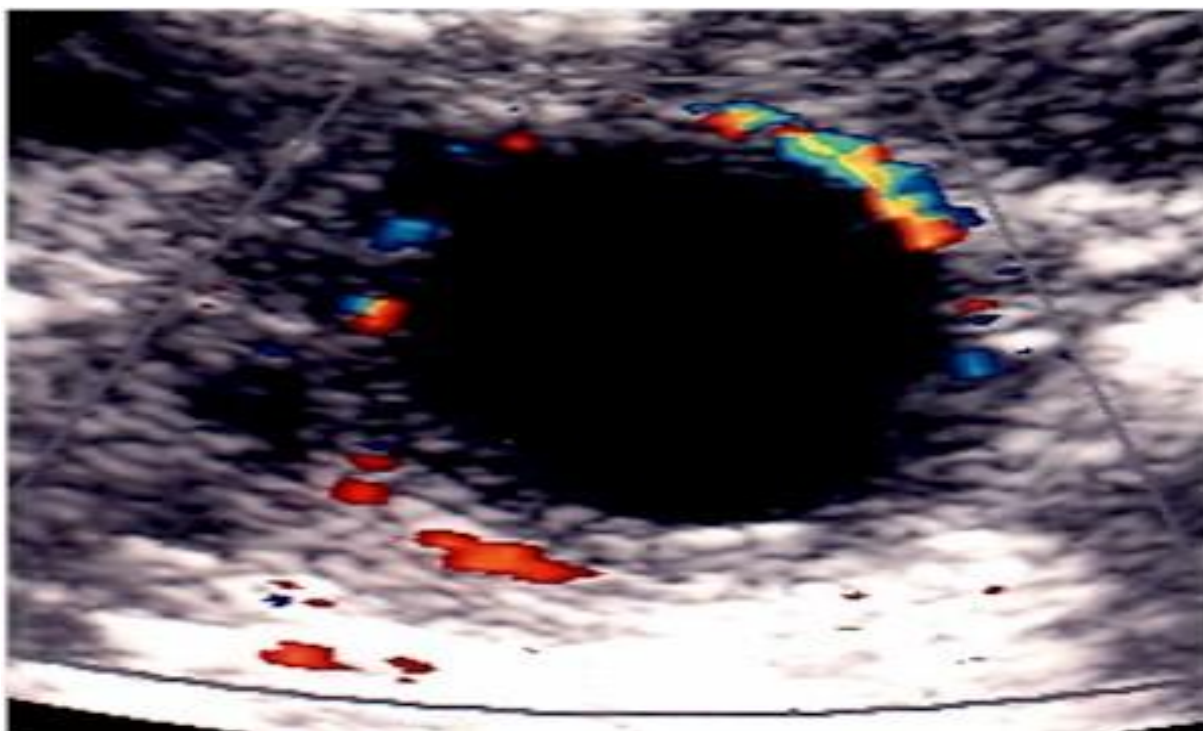
**Obr. 9.** Změny v objemu a vaskularitě dominantního, nedominantního ovaria, žloutkového váčku a placenty v 5.–11. týdnu gravidity. Převzato z Järvelä IY, Ruokonen A, Tekay A. Effect of rising hCG levels on the human corpus luteum during early pregnancy. Hum Reprod. 2008 Dec; 23(12), p. 2775–27881.



**Obr. 10.** Objem dominantního ovaria s funkčním žlutým tělískem při zobrazení pomocí programu VOCAL.



**Obr. 11.** Zobrazení normálního krevního průtoku v okolí corpus luteum s masivním perifolikulárním prokrvením.



**Obr. 12.** Zobrazení abnormálního krevního průtoku v okolí corpus luteum, kde můžeme vidět velmi nízké perifolikulární prokrvení. Tento nález může být podle některých autorů spojován s neúspěšností stimulovaného cyklu, habituálními potraty a defektem luteální fáze.

### 3. Cíle práce a pracovní hypotézy

1. Vymezení nových aplikací 3D ultrasonografie v diagnostice žen zařazených do programu asistované reprodukce. **Definice ultrasonografických prediktivních faktorů v hodnocení kvality oocyту** a rozšíření znalostí fyziologie a patofyziologie folikulogeneze v prospektivní pilotní studii 17 žen, zařazených do programu IVF/ICSI, kde jsme hodnotili prokrvení ovaria a kodominantního folikulu (s max. průměrem pro každé ovarium) pomocí metody 3D UZ PDA a stupně perifolikulární vaskularity.

#### Medicínská hypotéza:

Regionální změny prokrvení folikulu nastávající během ovulace jsou dávány do souvislosti s jeho zráním. Z oocytů vysoce vaskularizovaných folikulů byla získána kvalitní embrya, která následně úspěšně implantovala a vedla k pokračujícímu těhotenství. Včasná identifikace vysoce kvalitních folikulů by mohla sloužit jako jedna z cest umožňujících velmi ranou selekci oocytů a embryí s nejvyšší vývojovou kompetencí a nadějí na úspěšnou implantaci.

2. Prospektivní studie hodnotící endometriální receptivitu pomocí neinvazivního 3D power Doppler ultrasonografického měření endometriálních a ovariálních parametrů v predikci výsledků FET cyklu v den transferu rozmrazených embryí a době očekávané implantace u těhotných a netěhotných žen.

2.1 Srovnání 3D ultrasonografických parametrů s hladinou systémových steroidů

2.2 Význam detekce aktivovaného žlutého tělíska v těhotenství již v prvním týdnu po provedení FET

#### Medicínská hypotéza:

Schopnost prospektivního určení děložní receptivity pomocí neinvazivních metod ultrasonografického vyšetření by mohla ovlivnit úspěšnost léčby metodou asistované reprodukce. Předpokládáme, že analýza power Doppler signálu v daném objemu bude lépe popisovat celkové prokrvení vyšetřovaného orgánu než analýza 2D ultrazvukového zobrazení či měření rychlosti průtoku krve v jednotlivých cévách.

- 3. Srovnání hormonální sekrece corpus luteum a placenty ve vztahu k 3D power Doppler ultrasonografickým měřením prokrvení a objemu ovaríí a corpus lutea u primigravid a multigravid po spontánní koncepci během 5.–11. týdne těhotenství. Využití těchto poznatků v problematice placentární kompetence a suplementace těhotenství funkčně agonadálních žen, těhotných po léčbě metodami asistované reprodukce.**

3.1 Zhodnocení vztahu parity a funkce corpus luteum odrážející změny v hladinách hCG a luteálních hormonů

3.2 Srovnání hladin mateřské hormonální sekrece ve vztahu k pohlaví plodu

3.3 Rozšíření znalostí problematiky placentární kompetence, luteoplacentární shift

Medicínská hypotéza:

Znalost hormonálních hladin steroidů produkovaných CL a následně placentou v 5.–11. týdnu těhotenství po spontánní koncepci může s přesností určit dávkování a nezbytnou délku hormonální suplementace v raném těhotenství u funkčně agonadálních žen. Počet předchozích těhotenství a porodů může ovlivňovat hladiny mateřského hCG v následném těhotenství a pohlaví plodu by mohlo ovlivňovat hormonální placentární sekreci.

## **4. Použité metody**

### **4.1 Soubor pacientů a metoda 3D a PDA ultrasonografického měření**

#### **4.1.1 Využití a význam 3D ultrasonografie v predikci kvality a vývoje oocyту**

Do studie bylo zařazeno 17 pacientek stimulovaných v dlouhém protokolu (depotní agonista – GnRH podaný týden před očekávanou menstruací) a následně za 15 dní po „down“ regulaci, splňující tyto podmínky:

1. výška endometria méně než 5 mm
2. žádné folikuly nad 10 mm
3. hladina estradiolu méně než 50 pg/ml
4. stimulace FSH rekombinantními preparáty (Puregon/gonal pen)

Vyloučeny byly ženy :

1. nesouhlasící s vyšetřením v den odběru vajíček
2. jejichž stimulace byla zastavena pro riziko OHSS
3. po operaci ovarií či po jednostranné ovariectomii
4. s vrozenou vývojovou vadou dělohy
5. s hladinou FSH nad 10 mIU/l v časně folikulární fázi
6. s anamnézou ovariálních cyst.

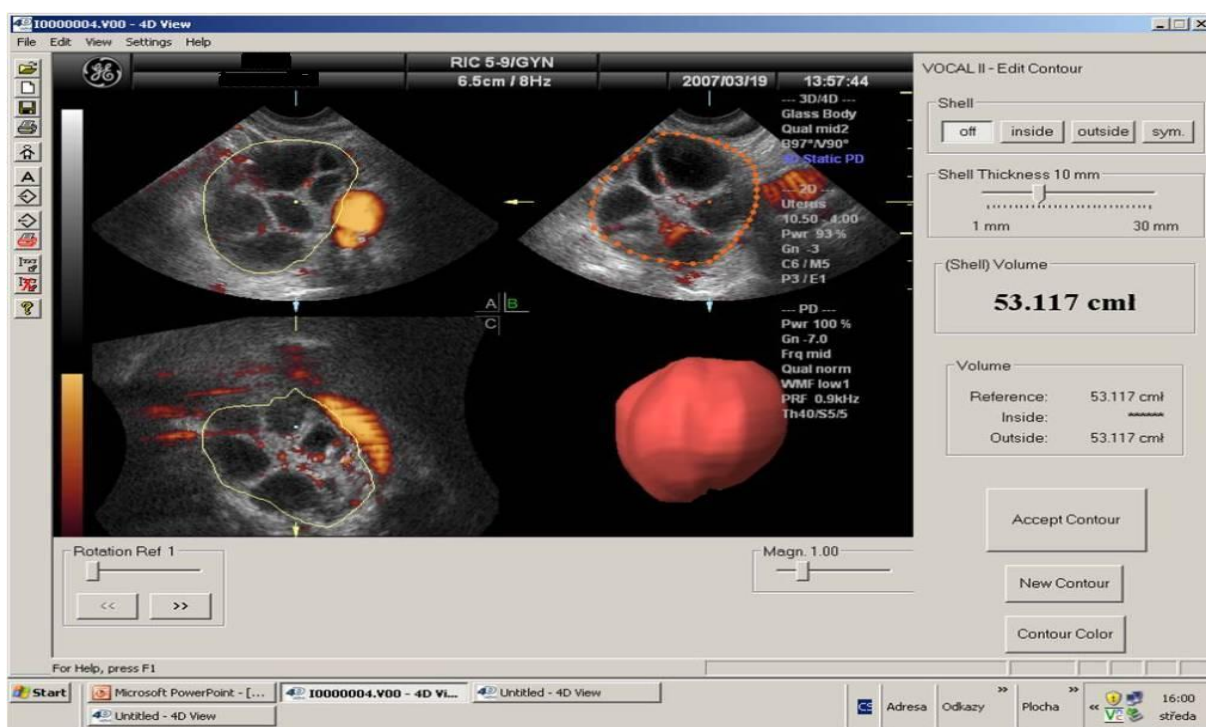
Z důvodu zamezení mužského vlivu sterility na výsledek oplodnění byla ve všech případech provedena metoda ICSI. 3D ultrasonografická vyšetření a power Doppler sonografie ovarií a kodominantního folikulu byla prováděna v den aplikace hCG (Pregnyl 10 000 IU i.m.) před odběrem vajíček. Všechna sonografická vyšetření byla provedena jedním vyšetřujícím (T. Z.) u pacientek v gynekologické poloze pomocí přístroje Voluson Expert 760, Kretz, Zipf, Austria vybaveného multifrekvenční (3–9 mHz) vaginální sondou snímající 146° rozsah pole. Objem ovaria, kodominantního folikulu, vaskularizačního indexu (VI), flow indexu (FI), a vascularization-flow indexu (VFI), střední hodnotou šedi (MG), stupeň perifolikulární vaskularity a PI a RI folikulární arterie byly měřeny pro každé ovarium zvlášť. Kodominantní folikul byl vybrán jako folikul maximálního průměru a jeho objem (FV) byl stanoven podle matematického vzorce objemu koule:  $FV (ml) = 4,1888 \times (MD/2 (cm))^3$ . Nastavení snímání power Doppler signálu by mělo být vždy na maximum v longitudinální rovině zahrnující celý povrch ovaria. U každého vyšetření byla dodržena následující přednastavení přístroje (colour gain from –3 to –7, normal colour quality, wall motion filter, low 1, peak repetitive frequency PRF 0.9 KHz). Vzhledem k jednotnosti anglického značení názvů ovládacího panelu



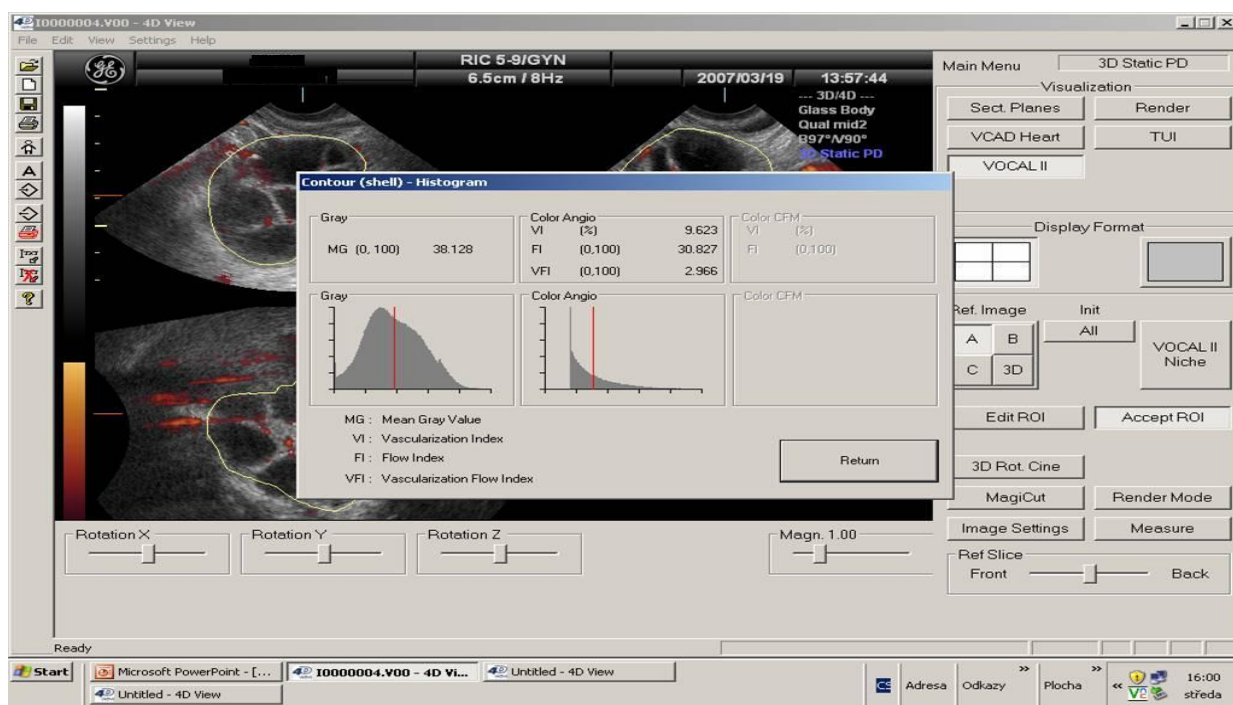
celosvětovými výrobci ultrasonografických přístrojů nadále tyto názvy (gain – zesílení, frekvency – frekvence, filter) nepřekládáme. Pro dosažení snímání adekvátního power Doppler signálu byl nastaven 3D box k sejmutí objemu dat z oblasti zájmu našeho měření (region of interest, ROI).

Ke kalkulaci ovariálních objemů byl použit zobrazovací program VOCAL, kdy užití manuální modu umožňuje kontury jednotlivých ovariálních řezů zhotovených při rotačních krocích každých 15° v longitudinální rovině. K hodnocení prokrvení je využito možnosti kalkulace 3D PDA indexů (VI, FI, VFI) vypočtených z barevného histogramu získaného programem VOCAL.

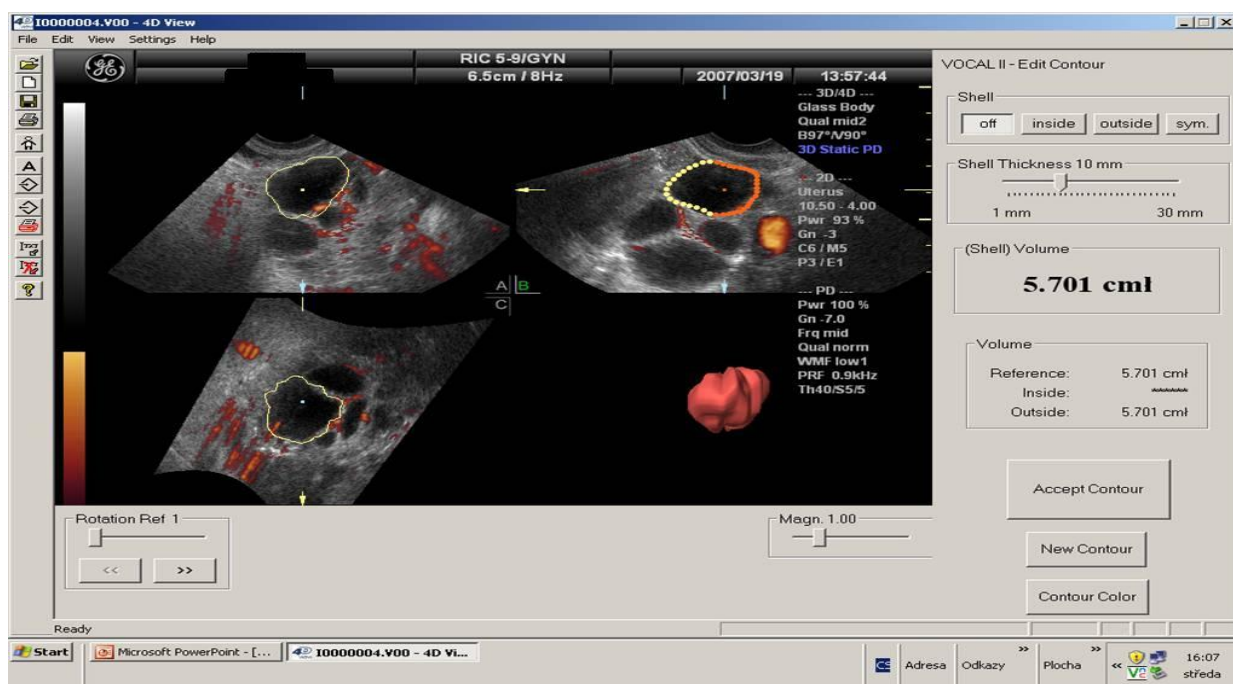
K hodnocení perifolikulární vaskularity byl využit skorovací systém, kde 25 % periferního prokrvení odpovídá 1. stupni, 26–50 % 2. stupni, 51–75 % 3. stupni, 75% a více 4. stupni prokrvení, přičemž folikuly 3. a 4. stupně mají nejvyšší stupeň prokrvení (15). Oocyty získané z kodominantního folikulu obou ovarii byly fertilizovány metodou ICSI a následně zvlášť sledován růst a vývoj daného embrya. Vývoj embryí byl klasifikován do 4 stupňů podle skorovacího systému hodnotícího morfolickou preimplantační kvalitu embryí v souladu s našimi konvenčními kritérii zahrnujícími velikost blastomer a stupeň fragmentace (g1 – blastomery jednotné velikosti a tvaru, žádná nebo minimální fragmentace; g2 – blastomery nestejně velikosti a tvaru s fragmentací < 10 % povrchu embrya; g3 – s fragmentací 10–30 % a g4 – s fragmenty > 30 % povrchu embrya) (41).



**Obr. 13.** Zhodnocení ovariálního objemu v programu VOCAL s využitím manuálního modu, kde obrysy jednotlivých ovariálních řezů jsou zhotoveny při rotačních krocích každých 15° v longitudinální rovině.



**Obr. 14.** Zhodnocení ovariální vaskularity pomocí 3D PDA indexů: vascularization index (VI), flow index (FI) and vascularization flow index (VFI). Tyto indexy byly kalkulovány pomocí programu VOCAL při využití histogramu získaného z přepočtu ROI (Region of interest).



**Obr. 15.** Výpočet objemu kodominantního folikulu, stanoveného jako folikul maximálního průměru. Objem (FV) byl stanoven podle matematického vzorce objemu koule:  $FV (ml) = 4,1888 \times (MD/2 (cm))^3$ .

#### **4.1.2 Zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu**

Do studie bylo zařazeno 30 žen bez známé gynekologické patologie (např. endometrióza, děložní myomy, předchozí operace gynekologických orgánů), podstoupivší FET v nativním menstruačním cyklu (3–4 dny po pozitivním výsledku LH testu z moče v závislosti na vývojovém stadiu zamrazených embryí) od května 2004 do února 2008 v centru asistované reprodukce gynekologicko-porodnické kliniky univerzitní nemocnice v Oulu, Finsko. Studie byla schválena Etickou komisí univerzitní nemocnice v Oulu. Obsah a záměr studie byl plně osvětlen všem participujícím pacientkám s následným získáním jejich informovaného souhlasu. Vzorky krve pro hormonální stanovení (17-OHP, P, E2) a 3D ultrasonografická vyšetření byla provedena v den FET a poté o 5-9 dní později, včetně analýzy celkového hCG. Čtyři pacientky se nezúčastnily 2. vyšetření. Indikací pro předchozí IVF či ICSI byl mužský faktor, tubární faktor, anovulace, endometrióza, smíšená či nevysvětlitelná příčina sterility (**Tab. 2.1**). ICSI bylo provedeno u 16 párů s těžkými poruchami spermiogramu (**Tab. 2.1**). Během IVF/ICSI stimulace v dlouhém protokolu byla zamrazena zbývající nepoužitá embrya po dvoudenní kultivaci pomocí pomalého mrazicího protokolu s užitím 1,2-propandiolu jako kryoprotektantu. Podle protokolu FET používaného na klinice v Oulu bylo transvaginální ultrasonografické vyšetření prováděno během 10.–12. dne menstruačního cyklu, kdy byla zhodnocena velikost dominantního folikulu, strana ovulujícího ovaria a šíře endometria. Po ultrasonografickém vyšetření ženy začaly každé ráno sbírat vzorky moče pro potvrzení ovulace v LH (luteinizační hormon) testu (home test kit, Clearplan; Unipath, Bedford, UK). Embryotransfer rozmrazených embryí (FET) byl prováděn v přirozeném menstruačním cyklu bez jakékoliv hormonální stimulace 3–4 dny po prvním pozitivním výsledku LH (luteinizační hormon) testu z moče. Maximálně byla transferována 2 embrya. Embrya byla hodnocena podle stejných kritérií jako ve skórovacím systému pro zavádění čerstvým nerozmrazených embryí. Za embryo nejvyšší kvality bylo považováno embryo se 4 blastomery 2. den, 8 blastomery 3. den po oplození, neobsahující mnohojaderné blastomery a mající méně než 20 % fragmentů celkového objemu (86). Po provedeném FET pacientky užívaly 200 mg progesteronu dvakrát denně per os či vaginálně podle jejich preference. Při potvrzení gravidity pokračovaly v užívání progesteronu do 10. gestačního týdne.

3D TVUZ vyšetření (Voluson Expert 730, Kretz, Zipf, Austria) bylo prováděno v den FET a opakováno o týden později, v době očekávané implantace. Výsledky ultrasonografického vyšetření neovlivňovaly následnou klinickou léčbu a její postup. 3D UZ vyšetření umožňovalo zhodnocení endometriálního, subendometriálního a ovariálního objemu včetně možných změn prokrvení.

U každého vyšetření byla dodržena následující přednastavení přístroje (frequency, mid; dynamic set, 2; balance,  $G > 170$ ; smooth, 5/5; ensemble, 16; line density, 7; power Doppler map, 5) a nastavení podmínek pro power Doppler mode byly: gain,  $-5.6$ ; quality, normal; wall motion filter, low 1; peak repetitive frequency PRF, 0.9 kHz. Během druhého vyšetření, kdy byly některé pacientky již těhotné, nebyl použit power Doppler mode k vyšetření dělohy. Důvodem bylo všeobecně známé stanovisko International Society for Ultrasound and Gynecology (ISUOG) dávající doporučení k omezenému užíváním Doppleru v I. trimestru těhotenství (66). Při ultrasonografickém vyšetření byla nejdříve vizualizována děloha pomocí (2D) 2B-mode při vyprázdněném močovém měchýři a následně byl použit power Doppler mode tak, aby power Doppler box zaměřil celou dělohu. Do 3D zobrazení byl obraz nastaven přepnutím na volume mode. Většinou jsme vystačili s nastavením rozsahu výkyvu UZ hlavičky  $80^\circ$  a vybrali nastavení rychlého získání objemu dat (nízké rozlišení) k zamezení zkreslení artefakty. Poté byla obdobným způsobem snímána obě ovaria. Vyšetření obsahující objemová data každé pacientky byla uložena na hard disk a poté analyzována pomocí zobrazovacího programu VOCAL (Virtual organ computer-aided analysis imaging program, GE Healthcare, Zipf, Austria) k získání analýzy 3D power Doppler histogramu. K sejmutí celkového objemu oblasti našeho zájmu měření (Region of interest – ROI) bylo použito manuálního modu konturovacího editoru programu VOCAL při rotačních krocích každých  $15^\circ$ . Proto bylo analyzováno 12 obrysů rovin pro každou ROI k dosažení  $360^\circ$ . Po získání celkového objemu v ROI byla provedena kalkulace poměru barevných voxelů (Volumetric picture element) k jejich celkovému počtu. Tento poměr (%) byl vyjádřen jako vaskularizační index (Vascularization index, VI). Vaskularizační objem (ml) endometria či ovaria byl vypočítán vynásobením celkového objemu ROI jeho vaskularizačním indexem VI. Pomocí programu VOCAL byl automaticky kalkulován index střední hodnoty šedi (Mean grayness, MG) v ROI, prezentující průměrnou hodnotu z celkové škály šedi barevných voxelů. Endometriální výška byla měřena jako nejširší část v longitudinální rovině zobrazující obě linie ohraničující endometrium. Struktura endometria byla zhodnocena ve stejné rovině a popsána jako triple line či homoechogenní endometrium. Echogenita endometria ve srovnání se subendometriem byla zhodnocena dvěma různými metodami. Nejprve první vyšetřující (T. Z.) zhodnotil echogenitu endometria subjektivně a popsal jako hyperechogenní, hypoechogenní či homoechogenní oproti echogenitě subendometria/myometria. Při druhé metodě bylo použito kalkulace střední hodnoty šedi (mean grayness, MG) pomocí programu VOCAL. MGendom představuje střední hodnoty šedi endometria a MGsubendom střední hodnoty šedi subendometria.

Subendometriální objem byl kalkulován po stanovení oblasti subendometria jako oblasti 5 mm intimně k hranici endo-myometriální junkce. Reprodukovatelnost měření pro výpočet objemu a prokrvení pomocí 3D TVUZ byla určena v předchozích měřeních. Korelační koeficient pro měření uvnitř studie (ICC, intraobserver correlation coefficient) byl stanoven pro hodnoty objemu na 1,0 a pro VI na 0,898 (33).

#### **4.1.3 Vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství**

Do studie bylo zařazeno 41 dobrovolně se účastnících žen bez anamnézy jakékoliv gynekologické patologie (např. endometrióza, myomy, předchozí operace gynekologických orgánů), nekuřáčky, po spontánním početí, navštěvující prenatální ambulance gynekologicko-porodnické kliniky univerzitní nemocnice v Oulu. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas a studie byla schválena Etickou komisí univerzitní nemocnice v Oulu. Po zjištění těhotenství ve 4.–8. gestačním týdnu byly tyto pacientky sledovány každý týden do konce 11. týdne gravidity. Při každé návštěvě byla odebrána krev na hormonální analýzu sérového human chorionic gonadotropinu (hCG), progesteronu (P), 17-OH progesteronu (17-OHP), estradiolu (E2), testosteronu a PAPP-A a provedeno ultrasonografické vyšetření objemů a vaskularizace dominantních ovaríí pomocí 3D PDA k identifikaci žlutého tělíska. Hodnoty ultrasonografických měření a hormonálních hladin byly analyzovány po předchozí dekadické logaritmické transformaci jejich AUC (areas under curve). Výpočet očekávaného termínu porodu (EDD, estimated date of delivery) byl proveden pomocí měření CRL (crown-rump length).

3D ultrasonografické vyšetření (Voluson Expert 730; Kretz, Zipf, Austria) bylo provedeno vaginální sondou, 3D power Doppler byl použit pouze k vyšetření prokrvení ovaríí a k identifikaci CL, nikoliv k vyšetření těhotné dělohy. U každého vyšetření byla dodržena následující přednastavení přístroje (frequency, mid; dynamic set, 2; balance,  $G > 170$ ; smooth, 5/5; ensemble, 16; line density, 7; a power Doppler map, 5). Nastavení podmínek pro power Doppler mode byly: gain – 5.6; quality, normal; wall motion filter, low 1; peak repetitive frequency, PRF 0.9 KHz. K získání objemových dat a vaskularizace ovaríí obsahujících CL byl použit zobrazovací program VOCAL (Virtual organ computer-aided analysis imaging program, GE Healthcare, Zipf, Austria) pro analýzu 3D power Doppler histogramu. K sejmutí celkového objemu ovaríí bylo použito manuálního modu konturovacího editoru programu VOCAL při rotačních krocích každých 30° (33, 35).

Proto bylo analyzováno 6 obrysů rovin pro každé ovarium k dosažení 180°. Po získání celkového ovariálního objemu byla provedena kalkulace poměru barevných voxelů (Volumetric picture element) k jejich celkovému počtu a tento procentuální podíl z celkového objemu (%) byl vyjádřen jako vaskularizační index (Vascularization index, VI). Vaskularizační objem (ml) ovaria byl vypočítán vynásobením celkového ovariálního objemu jeho vaskularizačním indexem VI. Korelační koeficient (ICC) pro měření uvnitř studie byl stanoven pro hodnoty objemu, VI a vaskularity (0,99; 0,85 a 0,94) v předešlé studii (36).

## **4.2 Laboratorní stanovení**

Laboratorní stanovení definovaných parametrů byla provedena pouze ve druhé studii týkající se zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu a ve třetí studii posuzující vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství.

### **4.2.1 Zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu**

Odběr krve pro stanovení sérové hladiny progesteronu (P), 17-hydroxyprogesteronu (17-OHP) a estradiolu (E2) byl proveden v den přenosu rozmrazených embryí (FET) a o týden později společně s analýzou sérového celkového hCG. Těhotenství bylo potvrzeno ultrazvukovým vyšetřením po prvním provedeném pozitivním těhotenském testu z moči a následně potvrzením srdeční akce v 7. týdnu těhotenství. Koncentrace sérového P a hCG byly měřeny systémem automatizované chemiluminiscence (Advia Centaur, Bayer Corporation, NY, USA), 17-OHP pomocí radioimunoanalýzy (Diagnostic Products Corporation, LA, USA), E2 také metodou radioimunoanalýzy (Orion Diagnostica, Oulunsalo, Finland) podléhající instrukcím stanoveným výrobcem. „Intra-assay a interassay“ hodnoty variačního koeficientu byly 3,7 % a 5,4 % pro P, 5,0 % a 5,4 % pro 17-OHP, 2,0 % a 3,5 % pro hCG, 5,7 % a 6,4 % pro E2. Systém kontroly externí kvality pro hormonální analýzu byl udělen národní (Labquality Ltd., Helsinki, Finland) a mezinárodní (Bio-Rad Laboratories EQAS, Irvine, CA) společností.

#### **4.2.2 Vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství**

Hladiny sérového testosteronu, progesteronu a hCG byly vyšetřovány pomocí systému automatizované chemiluminiscence (Advia Centaur; Bayer Healthcare LCC, Diagnostic Division, Tarrytown, NY, USA). Sérová koncentrace pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) byla stanovena pomocí metody fluorescenční spektrometrie (PerkinElmer, Turku, Finland). Pro stanovení hladin 17-OH progesteronu (17-OHP) a estradiolu (E2) bylo využito radioimunoanalýzy (Orion Diagnostica, Oulunsalo, Finland), podléhající výrobním kritériím.

„Intra-assay a interassay“ hodnoty variačního koeficientu byly 5,0 a 5,4 % pro 17-OHP, 4,0 a 5,6 % pro testosteron, 5,7 a 6,4 % pro E<sub>2</sub>, 3,7 a 5,4 % pro progesteron, 2,0 a 3,5 % pro hCG, 3,5 a 4,9 % pro PAPP-A. Systém kontroly externí kvality pro hormonální analýzu byl udělen národní (Labquality Ltd., Helsinki, Finland) a mezinárodní (Bio-Rad Laboratories EQAS, Irvine, CA) společností.

### **4.3 Statistická analýza dat**

#### **4.3.1 Využití a význam 3D ultrasonografie v predikci kvality a vývoje oocytu**

Statistická analýza dat byla provedena pomocí statistického programu „R programming language“, (<http://cran.r-project.org>), verze 2.4.1. Pro porovnání vybraných veličin skupiny těhotných a netěhotných žen jsme použili metody deskriptivní statistiky a vyjádření hladin statistické významnosti pomocí p-hodnoty pravděpodobnostních testů při ověřování dané hypotézy. Pro spojitě veličiny nebyla vzhledem k malé velikosti výběru a asymetrii v rozdělení dat stanovena mez normality. V následujících tabulkách jsou uvedeny mediány a rozsah (minimum a maximum) každé spojitě proměnné spolu s p-hodnotou dvouvýběrového Wilcoxonova testu. KATEGORIÁLNÍ DATA vyjadřujeme v tabulce počtem s přepočítáním na procenta případů, tedy pomocí absolutních a relativních četností. Pro porovnání dvou skupin pacientek jsme u kategoriálních veličin použily vyjádření pomocí p-hodnot Fisherova exaktního testu <http://www.langsrud.com/fisher.htm/>. Ultrasonografické a power Doppler angiografické parametry, měřené na obou vaječnících, jsou analyzovány pro každý vaječník zvlášť.



#### **4.3.2 Zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu**

Statistická analýza dat byla provedená pomocí statistického programu SPSS (Statistical Package for the Social Science) (Release 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Odchylky od normálního rozdělení zkoumaných veličin byly zhodnoceny pomocí Kolmogorov–Smirnov testu. Pro párové srovnání veličin bylo použito parametrického párového T- testu, resp. neparametrického Wilcoxonova testu pro asymetrické rozdělení dat. Závislost byla zhodnocena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Rozdělení četností byla porovnána pomocí chí-kvadrát testu. Rozdíly ve výše uvedených testech byly považovány za statisticky významné při hladinách významnosti menších než 0,05 (p-value, Sig two-tailed).

#### **4.3.3 Vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství**

Statistická analýza dat byla provedena pomocí statistického programu SPSS (Statistical Package for the Social Science) (Release 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). K měření statistické významnosti ve skupině a k odlišení parametrů mezi skupinami bylo využito obecného lineárního modelu (GLM test). Hormonální koncentrace, vaskularizaci a objemová měření jsme vyjádřili pomocí  $AUC_s$  (plocha pod křivkou) rozdělené do jednotlivých období těhotenství (amenorhey): 42.–48. den (6. týden těhotenství), 49.–55. den (7. týden těhotenství), 52.–62. den (8. týden těhotenství), 63.–69. den (9. týden těhotenství) a 70.–76. den (10. týden těhotenství). AUC nemohla být spočítána pro 77.–83. den (11. týden těhotenství), protože jsme již nevyšetřovali pacientky ve 12. gestačním týdnu. Dále bylo několik pacientek vyšetřeno během 28.–34. dne, a proto jsme nespočítali  $AUC_s$  pro den 35.–41. (5. týden těhotenství). Původní  $AUC_s$  byla před analýzou transformována dekadickým logaritmem (transformace  $\log_{10}$ ). Pro srovnání hormonálních hladin séra a ovariální odpovědi ( $AUC_s$ ) obou skupin pacientek v určitém čase byl pro normálně rozdělené veličiny užít dvouvýběrový T test a pro asymetricky rozdělená data neparametrický dvouvýběrový Wilcoxonův neboli Mann-Whitney  $U$  test. Odchylky od normálního rozdělení dat byly zhodnoceny pomocí Kolmogorov–Smirnov testu. K posouzení nezávislého vlivu mateřských charakteristik na hladinu hormonů bylo použito regresního modelu v případě mateřského věku a váhy matky a analýzy rozptylu jednoduchého třídění v případě počtu těhotenství a pohlaví plodu. Hladiny významnosti  $p < 0,05$  byly stanoveny jako signifikantní. Hodnoty všech zkoumaných veličin jsou vyjádřeny jako střední hodnota  $\pm$  standardní odchylka (SE).



## 5. Výsledky

### 5.1 Klinická sledování a výsledky ultrasonografických a laboaratorních měření

#### 5.1.1 Využití a význam 3D ultrasonografie v predikci kvality a vývoje oocyty

Ze 17 žen zařazených do stimulace IVF/ICSI 5 otěhotnělo (29,4 %) a 12 nikoliv (70,6 %). Byly hodnoceny všeobecné a klinické charakteristiky IVF/ICSI stimulace včetně 3D power Doppler ultrasonografických měření objemu, vaskularity ovarií a kodominantního folikulu ve vztahu k preimplantační morfologické kvalitě transferovaného embrya. Střední věk žen byl 32 let (rozmezí 26–36). Příčinou neplodnosti byl ve 12 případech (70,6 %) špatný spermioqram, ve 2 případech (11,8 %) porucha průchodnosti či odstranění vejcovodů a ve 3 případech (17,6 %) smíšená etiologie. V 11 případech (64,7 %) se jednalo o primární a v 6 případech (35,3 %) o sekundární poruchu fertility (**Tab. 1.1.**).

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientek rozdělených podle věku, typu, příčiny neplodnosti a dalších obecných a klinických charakteristik (**Tab. 1.1.**). Ve skupině těhotných žen byl v den ET signifikantně ( $p = 0,001$ ) větší počet embryí kvality 1. (41), signifikantně větší flow index kodominantního folikulu pravého ovaria ( $p = 0,044$ ) ve srovnání s výsledky měření levého ovaria a signifikantně častější zastoupení nejvyšší morfologické preimplantační kvality 1. a 2. embrya ( $p = 0,029$ ;  $p = 0,020$ ), která byla následně transferována (**Tab. 1.1, 1.3, 1.2**). Rovněž jsme zaznamenali častější výskyt kodominantního folikulu pravého ovaria s nejvyšším stupněm perifolikulárního prokrvení ( $p = 0,029$ ) ve skupině žen, které otěhotněly (**Tab. 1.4**).

V ostatních hodnocených ultrasonografických parametrech se skupina těhotných a netěhotných žen, pravděpodobně z důvodu malého souboru dat, statisticky významně nelišila. Nicméně 5% úrovní významnosti se přibližovaly P-hodnoty vaskularizačního indexu (VI) a vaskularizačně průtokového indexu (VFI), u nichž sledované proměnné měly tendenci nárůstu ve skupině těhotných žen (**Tab. 1.3.**).

Parametry	Těhotné (n = 5)	Netěhotné (n = 12)	p-value
Věk (roky)	32 (26–34)	32 (29–36)	0,488
Ceková dávka FSH (IU)	2250 (1500–2825)	2250 (1800–3750)	0,560
Dny FSH aplikace	14 (10–15)	13 (10–19)	0,873
Počet folikulů > 16 mm v den OPU	10 (6–28)	10 (5–17)	1,000
Počet získaných oocytů	6 (4–21)	7,5 (3–14)	0,792
Počet oplozených oocytů	6 (3–16)	4,5 (3–10)	0,486
Počet embryí 1. st. v den transferu	3 (2–4)	0 (0–2)	<b>0,001</b>
Den embryotransferu (1.–5. den kultivace embryí)	3 (2–5)	3 (0–5)	0,914
Typ sterility			0,600
Primární	4 (36,3)	7 (63,6)	
Sekundární	1 (16,7)	5 (83,3)	
Příčina sterility			0,547
Mužský faktor	4 (33,3)	8 (66,7)	
Tubární faktor	1 (50,0)	1 (50,0)	
Smišená	0 (0,0)	3 (100,0)	
Počet transferovaných embryí			1,000
1	0 (0,0)	1 (100,0)	
2	5 (31,2)	11 (68,8)	

**Tab. 1.1.** Obecné a klinické charakteristiky souboru pacientek ve vztahu k výsledkům IVF/ICSI cyklů. Hodnoty jsou uvedeny jako mediány a rozsah (minimum a maximum) každé spojitě proměnné spolu s p-hodnotou dvouvýběrového Wilcoxonova testu.

Parametry	Těhotné (n = 5)	Netěhotné (n = 12)	p-value
<b>Stupeň morfologické preimplantační kvality transferovaného 1. embrya</b>			<b>0,029</b>
1	5 (55,6)	4 (44,4)	
2	0 (0,0)	8 (100,0)	
3	0(0,0)	0(0,0)	
4	0(0,0)	0(0,0)	
Při OPU nezískané oocyty	0(0,0)	0(0,0)	
<b>Stupeň morfologické preimplantační kvality transferovaného 2. embrya</b>			<b>0,020</b>
1	4 (80,0)	1 (20,0)	
2	1(14,3)	6 (85,7)	
3	0 (0,0)	4 (100,0)	
4	0(0,0)	0(0,0)	
Při OPU nezískané oocyty	0 (0,0)	1 (100,0)	
<b>Stupeň morfologické preimplantační kvality selektovaného oocyty z 3D UZ měřeného kodominantního folikulu l. dx</b>			<b>0,080</b>
1	2 (100,0)	0 (0,0)	
2	3 (33,3)	6 (66,7)	
3	0 (0,0)	4 (100,0)	
4	0 (0,0)	1 (100,0)	
Při OPU nezískané oocyty	0 (0,0)	1 (100,0)	
<b>Stupeň morfologické preimplantační kvality selektovaného oocyty z 3D UZ měřeného kodominantního folikulu l. sin.</b>			<b>0,755</b>
1	2 (66,7)	1 (33,3)	
2	1 (33,3)	2 (66,7)	
3	2 (28,6)	5 (71,4)	
4	0(0,0)	0(0,0)	
Při OPU nezískané oocyty	0 (0,0)	4 (100,0)	

**Tab. 1.2.** Embryologické parametry ve vztahu k výsledkům IVF/ICSI cyklu. Kategoriální data vyjadřujeme v tabulce počtem s přepočítáním na procenta případů.

Parametry	Těhotné (n = 5)	Netěhotné (n = 12)	p-value
Celkový ovariální objem OV (ml) dx	43,96 (41,69–138,13)	42,55 (19,52–108,60)	0,279
Celkový ovariální objem OV (ml) l. sin	45,06 (43,86–116,96)	42,06 (11,32–102,38)	0,316
Objem kodominantního folikulu FV (ml) ovaria l. dx	6,08 (5,28–6,43)	5,38 (2,36–7,05)	0,154
Objem kodominantního folikulu FV (ml) ovaria l. sin	5,09 (4,08–5,65)	4,98 (3,26–9,63)	0,570
Vaskularizační index (VI) ovaria l. dx	12,47 (8,66–20,06)	8,22 (2,61–19,06)	0,066
Vaskularizační index (VI) ovaria l. sin	10,38 (5,02–25,43)	8,54 (6,20–11,72)	0,107
Průtokový index (FI) ovaria l. dx	47,85 (42,78–52,25)	40,46 (32,31–57,66)	<b>0,044</b>
Průtokový index (FI) ovaria l. sin	46,90 (35,23–48,90)	41,91 (28,83–51,47)	0,099
Vaskularizačně-průtokový index (VFI) ovaria l. dx	4,95 (2,85–8,46)	4,00 (0,90–10,05)	0,065
Vaskularizačně-průtokový index (VFI) ovaria l. sin	4,84 (2,30–10,05)	3,91 (2,82–4,62)	0,087
Index rezistence (RI) folikulární arterie kodominantního folikulu ovaria l. dx	0,56 (0,55–0,62)	0,53 (0,42–0,67)	0,081
Index rezistence (RI) folikulární arterie kodominantního folikulu ovaria l. sin	0,58 (0,50–0,62)	0,55 (0,38–0,71)	0,691
Index pulsatility (PI) folikulární arterie kodominantního folikulu ovaria l. dx	0,89 (0,83–1,00)	0,82 (0,65–1,24)	0,224
Index pulsatility (PI) folikulární arterie kodominantního folikulu ovaria l. sin	0,93 (0,65–1,09)	0,85 (0,49–1,53)	0,461

**Tab. 1.3.** 3D ultrasonografické PDA parametry hodnocené v den podání hCG ve vztahu k výsledkům IVF/ICSI cyklů. Hodnoty jsou uvedeny jako mediány a rozsah (minimum a maximum) každé spojitě proměnné spolu s p-hodnotou párového Wilcoxonova testu.

Parametry	Těhotné (n = 5)	Netěhotné (n = 12)	p-value
Stupeň perifolikulární vaskularity kodominantního folikulu ovaria l. dx			0,029
1.	1 (11,1)	8 (88,9)	
2.	1 (20,0)	4 (80,0)	
3.	3 (100,0)	0 (0,0)	
Stupeň perifolikulární vaskularity kodominantního folikulu ovaria l. sin			0,093
1.	1 (12,5)	7 (87,5)	
2.	2 (33,3)	4 (66,7)	
3.	2 (100,0)	0 (0,0)	

**Tab. 1.4.** Skórovací systém (Chui et al., 1997) hodnotící perifolikulární prokrvení v den hCG podání ve vztahu k výsledkům IVF/ICSI cyklu. Kategoriální data vyjadřujeme v tabulce počtem s přepočítáním na procenta případů.

### 5.1.2 Zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu

Ze 30 patientek účastnicích se studie otěhotnělo 50 % (15/30). Pro statistickou analýzu dat byly ženy rozděleny do dvou skupin, rozdělených podle toho, zda otěhotněly či nikoliv. Nebylo shledáno rozdílu v demografických, embryologických a klinických charakteristikách ani rozdílu v endometriální/subendometriální výšce, objemu a hodnotě vaskularizačního indexu (VI) mezi skupinou těhotných (15/30) a netěhotných žen (15/30) (**Tab. 2.1.**). Skupiny patientek se nelišily ani v 3D UZ ovariálních měřeních a sérových hladinách steroidů (P, estradiol, 17-OHP) ve dnu FET (**Tab. 2.2.**). Endometriální triple line byla ve FET signifikantně častěji přítomna u žen, které následně otěhotněly (93,3 % vs. 40,0 %, 95 % CI 25,5–81,2 %, P-value ze  $\chi^2$  testu 0,005). Ve skupině patientek s přítomností triple line byl počet těhotenství 70 % (14/20), zatímco ve skupině patientek s homoechogenním obrazem endometria byl počet těhotenství pouhých 10 % (1/10). Patientky byly dále rozděleny do dvou skupin podle endometriálního „cutoff“ objemu 2 ml. Počet těhotenství ve skupině patientek s endometriálním objemem nad 2 ml dosahoval 55 % (12/22) a ve skupině patientek s objemem pod 2 ml dosahoval 38 % (3/8), nicméně výsledek nebyl statisticky signifikantní (NS).

Echogenicita endometria ve dnu FET byla zhodnocena dvěma rozdílnými metodami (**Tab. 2.2.**). Rozdíl ( $MG_{\text{endom}} - MG_{\text{subendom}}$ ) dosahoval hodnot od 0,37 do 15,87 (střední hodnota  $6,36 \pm 0,9$ ) a vždy okolo 0 ve všech případech. Subjektivní zhodnocení potvrdilo stejné nálezy jako při hodnocení metodou VOCAL, tedy že endometrium bylo vždy více echogenní v UZ obraze než subendometrium.

Výsledky měření a charakteristiky cyklu týden po provedeném FET, v době očekávané implantace, shrnuje tabulka (**Tab. 2.3.**). Čtyři pacientky (3 těhotné, 1 nikoliv) se neúčastnily druhého vyšetření z osobních důvodů. Během druhého měření nebyl použit power Doppler k vyšetření dělohy, proto v tabulce nejsou obsaženy informace o prokrvení endometria a subendometria.

Týden po provedeném FET byl stále signifikantně ( $91,7\%$  vs.  $42,9\%$ ,  $95\%$  CI  $18,5-79,1\%$ ) častěji přítomen UZ obraz „triple line“ u žen, které otěhotněly a rovněž jejich **corpus luteum bylo aktivnější** (posuzováno podle zvýšení sérové hladiny 17-hydroxyprogesteronu a estradiolu oproti poklesu hladiny 17-OHP a objemu dominantního ovaria u žen, které neotěhotněly). Rovněž výška endometria byla signifikantně větší ve skupině těhotných žen v době měření. Neprokázali jsme rozdíly v ultrazvukových měřeních objemu a prokrvení dominantního i nedominantního ovaria mezi oběma skupinami žen.

Skupina těhotných měla při druhém měření signifikantně vyšší sérové hladiny 17-OHP ( $P = 0,009$ ) a estradiolu ( $P = 0,039$ ) oproti skupině netěhotných žen. Ze 12 pacientek, které finálně otěhotněly a byly dvakrát vyšetřovány, mělo 6 žen pozitivní hCG test v době druhého měření ( $7,2 \pm 0,2$  dnů po FET). Další 6 pacientek ze skupiny 12 finálně těhotných bylo v době druhého vyšetřování ( $5,3 \pm 0,4$  dnů po FET) hCG negativní, což značí, že měly pozitivní těhotenský test později.

Změny ultrasonografického měření a hormonálních hladin mezi prvním a druhým vyšetřením prezentuje **Tab. 2.4.** Ve skupině 12 těhotných pacientek stoupla hladina P a 17-OHP a rovněž jejich endometriální výška. Změny objemu a vaskularity dominantního ovaria u této skupiny shledány nebyly. U šesti pacientek s pozitivním hCG testem během druhého vyšetření byl pozorován obdobný nárůst v hladinách P a 17-OHP, endometriální výšce. Ve druhé skupině 6 finálně těhotných pacientek s hCG testem během druhé návštěvy negativním vykazovala nárůst pouze hladina P, měřeného ve dnu FET a o týden později. Ve skupině 14 neotěhotněvších žen vzrostla pouze hladina P po FET, zatímco objem dominantního ovaria klesl z  $15,9 \text{ ml} \pm 1,9$  na  $12,5 \text{ ml} \pm 1,8$  ( $P = 0,034$ ).

		<b>Těhotné ( n = 15 )</b>	<b>Netěhotné ( n = 15 )</b>	<b>p- value</b>
<b>Věk ( roky )</b>		31,3 ± 1,1	31,5 ± 1,1	0,905
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup> )</b>		22,9 ± 1,1	23,0 ± 0,8	0,941
<b>Porod</b>		0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0.372
<b>Těhotenství</b>		0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0.843
<b>Příčina sterility n (%)</b>				0.738
	<b>Mužský faktor</b>	8 (53,3 )	10 (66,7)	
	<b>Tubární faktor</b>	1 (6,7)	1 (6,7)	
	<b>Anovulace</b>	1 (6,7 )	0 (0 )	
	<b>Endometrióza</b>	2 (13,3 )	1 (6,7)	
	<b>Smíšená</b>	0 (0 )	1 (6,7 )	
	<b>Nevysvětlitelná</b>	3 (20,0 )	2 (13,3 )	
<b>Počet předešlých IVF</b>		1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,3	0,853
<b>Počet předešlých FET</b>		0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,533
<b>Počet transferovaných embryí n (%)</b>		1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,000
<b>Inseminační metody (%)</b>				0,075
	<b>IVF</b>	10 (66,7)	4 (26,7)	
	<b>ICSI</b>	5 (33,3)	11 (73,3)	
<b>LH test pozitivní v den cyklu</b>		14,7 ± 0,5	13,8 ± 0,7	0,246
<b>Embryotransfer, den cyklu</b>		18,0 ± 0,6	17,2 ± 0,6	0,368

**Tab. 2.1.** Demografické, klinické a embryologické charakteristiky ve skupině těhotných a netěhotných žen. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM či % (SEM = směrodatná chyba průměru). Mezi skupinou těhotných a netěhotných žen nebyly shledány signifikantě významné rozdíly.

		<b>Těhotné ( n = 15 )</b>	<b>Netěhotné ( n = 15 )</b>	<b>p-value</b>
<b>Výška endometria (mm)</b>		11,1 ± 0,3	11,2 ± 0,7	0,882
<b>Objem endometria (ml)</b>		3,7 ± 0,4	3,4 ± 0,7	0,669
<b>UZ obraz endometria (n, %)</b>				<b>0,005</b>
	<b>Homoechogenní</b>	1 (6,7 )	9 (60,0 )	
	<b>Triple line</b>	14 (93,3 )	6 (40,0 )	
<b>Endometriální vaskularizační index (VI) %</b>		0,9 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,661
<b>Endometriální vaskularizace** (ml)</b>		0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,887
<b>Subendometriální objem (ml)</b>		11,2 ± 0,9	11,3 ± 1,2	0,996
<b>Subendometriální vaskularizační index (VI) %</b>		4,1 ± 1,7	1,2 ± 0,4	0,110
<b>Subendometriální vaskularizace** (ml)</b>		0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,075
<b>Endometriální echogenicita*</b>				
<b>Subjektivní zhodnocení ( n, %)</b>				
	<b>Hyperechogenní</b>	15 ( 100)	15 ( 100)	
		0 (0)	0 ( 0 )	
	<b>Hypoechogenní</b>			
<b>Rozdíl (MG<sub>endom</sub> – MG<sub>subendom</sub>) (n, %)</b>				
	<b>&gt; 0</b>	15 ( 100)	15 ( 100)	
		0 ( 0 )	0 ( 0 )	
	<b>&lt; 0</b>			
<b>Objem dominantního ovaria (ml)</b>		17,0 ± 2,9	15,1 ± 1,8	0,562
<b>Vaskularizační index dominantního ovaria (VI) %</b>		9,2 ± 1,5	7,6 ± 1,1	0,382
<b>Vaskularizace dominantního ovaria ** (ml)</b>		1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,134
<b>Objem nedominantního ovaria (ml)</b>		9,0 ± 1,1	7,8 ± 0,7	0,376
<b>Vaskularizační index nedominantního ovaria (VI) %</b>		3,7 ± 0,7	5,2 ± 1,2	0,287
<b>Vaskularizace nedominantního ovaria ** (ml)</b>		0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,725
<b>Progesteron v den FET (nmol/l)</b>		25,4 ± 3,2	45,9 ± 12,7	0,130
<b>17-OHP v den FET (nmol/l)</b>		8,6 ± 0,4	9,6 ± 0,8	0,263
<b>Estradiol v den FET (nmol/l)</b>		0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,695

**Tab. 2.2.** Srovnání ultrasonografických a hormonálních parametrů v den FET mezi skupinou těhotných a netěhotných žen. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM či % (SEM = směrodatná chyba průměru). \*Echogenicita endometria oproti subendometriu byla hodnocena pomocí dvou různých metod, jednak subjektivně a jednak zhodnocením MG (mean gray value), vypočtené pomocí programu VOCAL. MG<sub>endom</sub>, střední hodnota šedi endometria, MG<sub>subendom</sub>, střední hodnota šedi subendometria.

\*\*Vaskularizace stanovená jako objem x VI.



	<b>Těhotné ( n = 12 )</b>	<b>Netěhotné ( n = 14 )</b>	<b>p-value</b>
<b>Počet dnů po FET</b>	6,3 ± 0,4	5,9±0,4	0,539
<b>Endometriální výška (mm)</b>	12,5 ± 0,6	10,6 ± 0,6	<b>0,049</b>
<b>Endometriální objem (ml)</b>	4,3 ± 0,7	4,1 ± 0,9	0,925
<b>UZ obraz endometria (n, %)</b>			<b>0,019</b>
	<b>Homoechogenní</b>	1(8,3)      8(57,1)	
	<b>Triple line</b>	11(91,7)      6(42,9)	
<b>Objem dominantního ovaria (ml)</b>	15,3 ± 1,5	12, 5 ± 1,8	0,255
<b>Vaskularizační index dominantního ovaria (VI) %</b>	10,5 ± 1,8	8,6 ± 1,63	0,446
<b>Vaskularizace dominantního ovaria ** (ml)</b>	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,084
<b>Objem nedominantního ovaria (ml)</b>	9,4 ± 1,5	8,2 ± 0,8	0,454
<b>Vaskularizační index (VI) % nedominantního ovaria</b>	3,3 ± 0,7	6,1 ± 1,3	0,072
<b>Vaskularizace nedominantního ovaria ** (ml)</b>	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,118
<b>Hladina progesteronu týden po FET(nmol/ l)</b>	174,5 ± 68,0	92,3 ± 18,3	0,224
<b>Hladina 17-OHP týden po FET(nmol/ l)</b>	15,1 ± 2,1	8,3 ± 1,3	<b>0,009</b>
<b>Hladina estradiolu týden po FET (nmol/ l)</b>	0,40 ± 0,06	0,25 ± 0,04	<b>0,039</b>

**Tab. 2.3.** Srovnání ultrasonografických a hormonálních parametrů týden po provedeném FET mezi skupinou těhotných a netěhotných žen. Čtyři pacientky byly vyloučeny z druhého měření. Power Doppler nebyl prováděn k vyšetření samotného těhotenství (plod a gestační váček, trofoblastická tkáň, placenta) u těhotných žen. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM či %. SEM = směrodatná chyba průměru. \*\* Vaskularizace stanovená jako objem x VI. 17-OHP = 17 hydroxyprogesteron.

	Těhotné (n = 12)	P-value	Těhotné, hCG pozitivní (n = 6)	P-value	Těhotné, hCG negativní (n = 6)	P-value	Netěhotné (n = 14)	p-value
<b>P1</b>	25,1 ± 3,3	<b>0,002</b>	24,2 ± 6,5 1	<b>0,005</b>	26,0 ± 2,4	<b>0,028</b>	48,7 ± 13,3	<b>0,041</b>
<b>P2</b>	74,5 ± 8,0		21,2 ± 23,9		227,8 ± 136,5		92,3 ± 18,3	
<b>17- OHP1</b>	9,0 ± 0,5	<b>0,015</b>	9,2 ± 0,8	<b>0,046</b>	8,8 ± 10,5	0,249	9,9 ± 0,8	0,300
<b>17-OHP2</b>	15,1 ± 2,1		16,9 ± 2,6		13,2 ± 3,3		8,3 ± 1,3	
Endometriální výška 1 (mm)	11,2 ± 0,4	<b>0,006</b>	11,4 ± 0,8	<b>0,028</b>	10,9 ± 0,2	0,075	11,2 ± 0,8	0,132
Endometriální výška 2 (mm)	12,5 ± 0,6		12,3 ± 1,0		12,7 ± 0,9		1 0,5 ± 0,6	

**Tab. 2.4.** Subanalýza hormonálních sérových koncentrací a endometriální výšky týden po FET. P–progesteron, 17-OHP – 17-hydroxyprogesteron. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM či %. SEM = směrodatná chyba průměru. Index 1 – měření v den FET, Index 2 – měření o týden později, v době 2. návštěvy. P-value longitudinální studie srovnávající parametry měření ve dnu FET a o týden později.

### 5.1.3 Vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství

Do studie bylo zařazeno 41 žen, přičemž 22/41 žen bylo primigravid (**Tab. 3.1.**). Primigravidy byly mladší než multigravidy a obě skupiny se nelišily v mateřské váze či body mass indexu (BMI). Všechna těhotenství byla bez komplikací a skončila termínovým porodem plodu normální váhy. Nebylo shledáno rozdílu v pohlaví či váze novorozence mezi skupinou primigravid a multigravid (**Tab. 3.1.**).

Hodnoty sérové hladiny **progesteronu** během prvního trimestru těhotenství u primigravid a multigravid jsou prezentovány v **grafu 1**. Dle GLM testu sekrece progesteronu (log10 transformed AUC) byla u primigravid vyšší než u multigravid ( $3,49 \pm 0,02$  vs.  $3,36 \pm 0,03$ ,  $p=0,003$ ) během gestačního týdne 6.–10. (42.–76. den gestace). Analýza rozptylu o jednom třídění veličin vyjadřující vliv mateřského věku, váhy a parity na hladiny P indikuje, že pouze parita statisticky významně ovlivnila hladinu progesteronu (**Tab. 3.3.**). Pohlaví plodu hladiny P neovlivnilo.

Sekrece **17-OHP** (log10 AUC ve dnech těhotenství 49–76) u primigravid stoupala ( $2,73 \pm 0,03$  vs.  $2,62 \pm 0,03$ ,  $p = 0,013$ ) oproti skupině multigravid (**Graf 1**). Analýza rozptylu o jednom třídění veličin prokazuje závislost 17-OHP sekrece na paritě, nikoliv už na váze, věku matky a pohlaví plodu (**Tab. 3.3.**).

GLM analýza opakovaných měření **testosteronu** neprokázala žádné změny mezi jednotlivými skupinami primigravid a multigravid během následných měření (**Graf 1**), tedy nebyly prokázány rozdíly v hodnotách AUC v jakémkoliv čase měření. Analýza rozptylu o jednom třídění veličin neprokázala žádnou závislost mezi mateřskými proměnnými (věk, váha, počet těhotenství) a hladinou T. Pouze pohlaví plodu jako nezávislý faktor ovlivňovalo sekreci T (**Tab. 3.3.**). GLM analýza srovnávající těhotenství zakončená porodem jak mužského, tak ženského plodu potvrdila, že sekrece T (log10 AUC) byla vyšší ( $1,96 \pm 0,04$  vs.  $1,77 \pm 0,06$ ,  $p=0,018$ ) u těhotenství s ženským pohlavím plodu v 6.–10. týdnu těhotenství (**Tab. 3.2, Graf 3**).

Analýza opakovaných měření **estradiolu** ukázala určité, nicméně nesignifikantní změny v hladinách E2 mezi oběma skupinami (**Graf 1**). Analýza rozptylu o jednom třídění veličin prokázala, že pouze parita a pohlaví plodu ovlivňuje sekreci estradiolu (**Tab. 3.3.**). Analýza opakovaných měření mezi těhotenstvím s mužským a ženským plodem potvrdila, že sekrece E2 byla vyšší ( $2,30 \pm 0,04$  vs.  $2,10 \pm 0,03$ ,  $p=0,002$ ) u těhotenství s ženským plodem než mužským v týdnu gravidity 6–10 (**Tab. 3.2, graf 3**).

Změna hladiny hCG během týdne gravidity 5–11 jsou prezentovány v **Grafu 2**. U primigravid byla sekrece **hCG** (log10 AUC od 42–76 dne gravidity) vyšší ( $6,54 \pm 0,03$  vs.  $6,39 \pm 0,05$ ,  $P = 0,010$ ) během týdne 8–11 ( $6,44 \pm 0,03$  vs.  $6,29 \pm 0,05$ ,  $P = 0,008$ ). Analýza rozptylu o jednom třídění veličin prokázala pouze vliv parity na log10 hCG AUCs (**Tab. 3.3.**).

Hladina **PAPP-A** během doby měření stoupala a analýza opakovaných měření neprokázala žádné rozdíly mezi oběma skupinami (**Graf 2**). Analýza rozptylu o jednom třídění veličin prokázala pouze signifikantní vliv parity na hladinu PAPP-A (**Tab. 3.3**). Analýza opakovaných měření ukazuje změny objemu dominantního ovaria během 5.–11. gestačního týdne, které se mezi skupinou primigravid a multigravid nijak významně nelišily (**Graf 2**). Objem ovaria nebyl ovlivněn věkem matky, váhou ani počtem těhotenství či pohlavím plodu, jak ukazuje analýza rozptylu o jednom třídění veličin (**Tab. 3.3.**).

Analýza opakovaných měření prokazuje změny **prokrvení dominantního ovaria** během následné studie, nikoliv už rozdíly mezi skupinou primigravid a multigravid (**Graf 2**). Analýza rozptylu o jednom třídění veličin prokázala, že **vaskularizovaný objem** nebyl ovlivněn věkem matky či paritou plodu (**Tab. 3.3.**).

		<b>Primigravidy (1. těhotenství)</b>	<b>Multigravidy (2. či pozdější těhotenství)</b>	<b>p-value</b>
Počet pacientek		22	19	
Věk, roky		24,5 (0,8)	27,6 (1,1)	0,024
Váha, kg		59,6 (1,6)	64,4 (2,7)	NS
Body mass index (BMI)		22,3 (0,5)	23,3 (0,8)	NS
Počet žen s	1.těhotenstvím *	22	0	< 0,001
	2.těhotenstvím *	0	8	
	3.těhotenstvím*	0	6	
	4.těhotenstvím*	0	2	
	5.těhotenstvím*	0	1	
	6.těhotenstvím*	0	2	
Počet žen s	žádným porodem	22	2	< 0,001
	1 porodem	0	12	
	2 porody	0	3	
	3 porody	0	2	
Počet žen sledovaných po dobu	3 týdnů	0	1	NS
	4 týdnů	1	2	
	5 týdnů	3	0	
	6 týdnů	4	5	
	7 týdnů	11	8	
	8týdnů	3	3	
Pohlaví	děvče	10 (45,5 %)	12 (63,2 %)	NS
	chlapec	12 (54,5 %)	7 (36,8 %)	
Váha plodu (g)	děvče	3539 (170)	3583 (108)	NS
	chlapec	3824 (194)	3863 (195)	NS
	všechny	3695 (132)	3686 (101)	NS

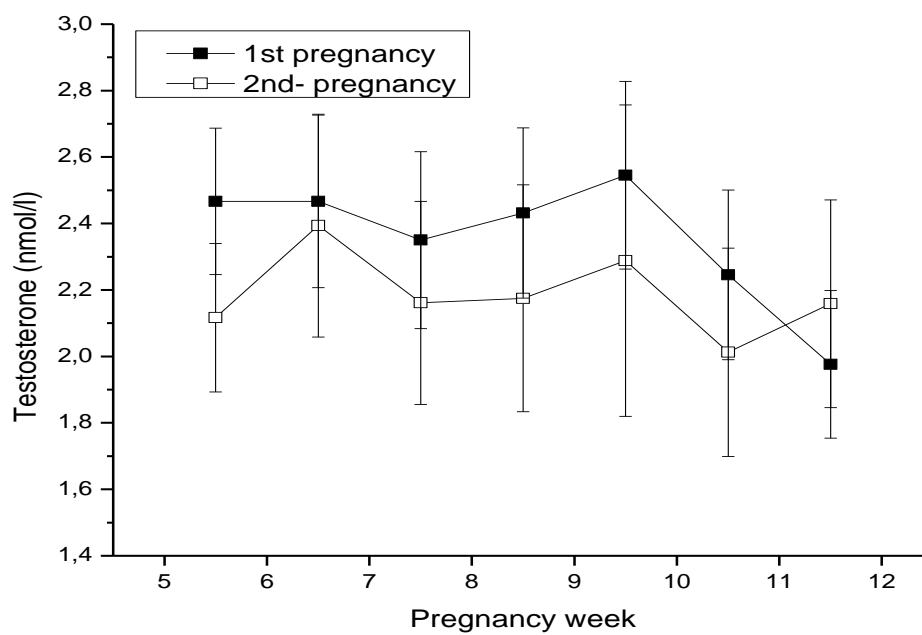
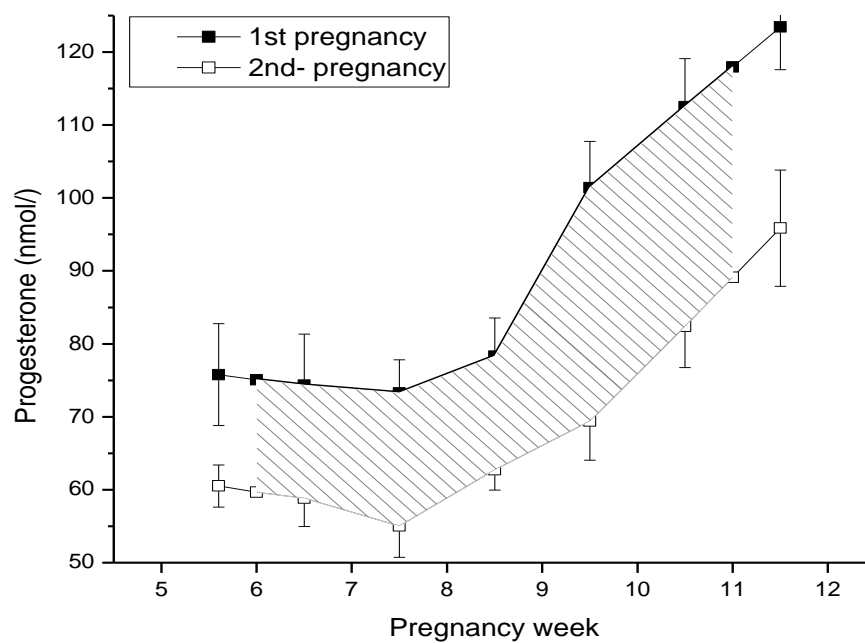
**Tab. 3.1.** Demografická data u primigravid a multigravid. \*Počet těhotenství/porodů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. NS – nesignifikantní výsledek.

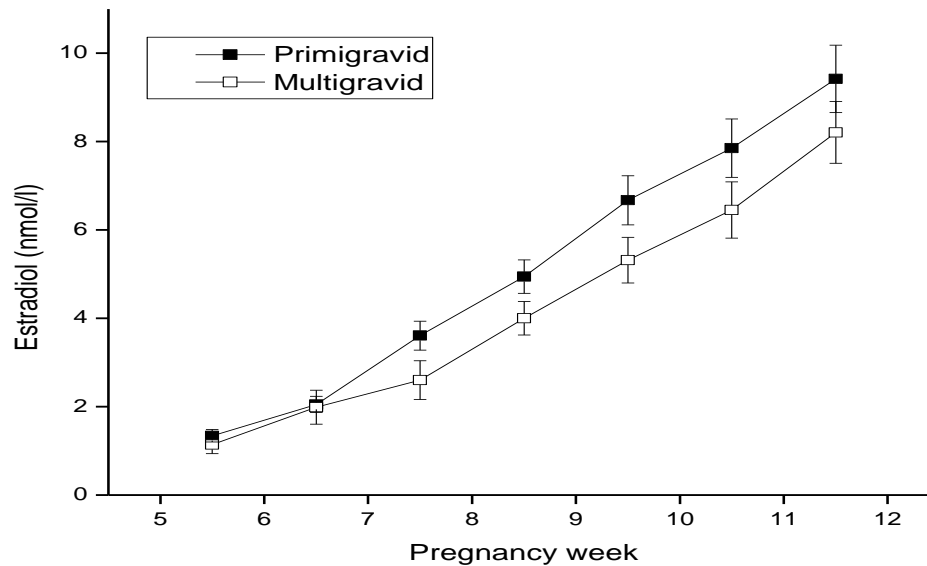
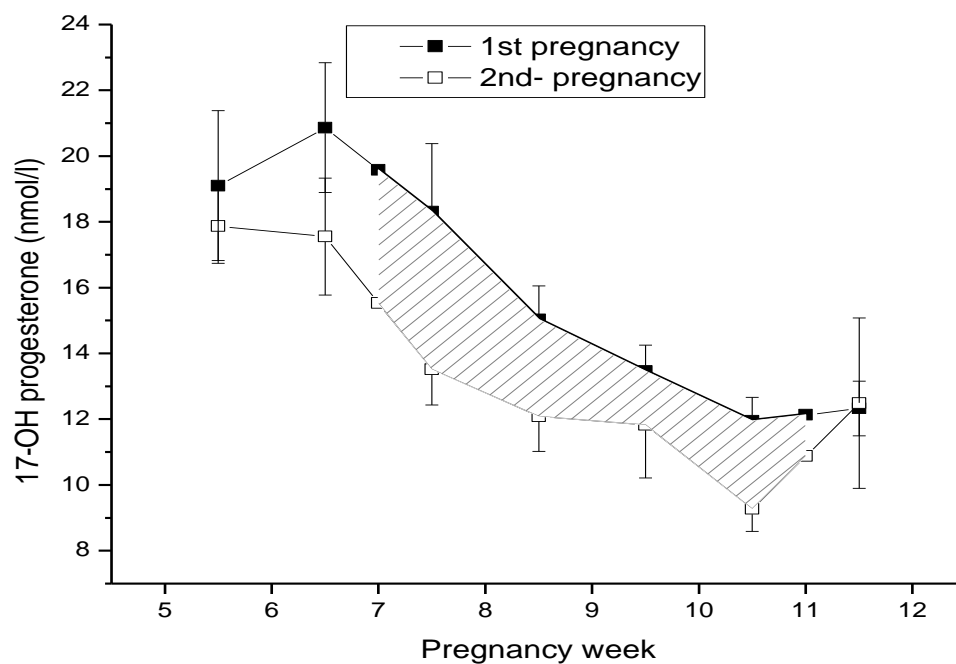
	<b>Týden těhotenství</b>	<b>Plod ženského pohlaví</b>	<b>Plod mužského pohlaví</b>	<b>p-value</b>
E2 AUClog10 (SE)	6	1,19 (0,05); n = 16	1,02 (0,05); n = 10	0,033
	7	1,40 (0,04); n = 20	1,25 (0,05); n = 13	0,029
	8	1,57 (0,03); n = 20	1,42 (0,04); n = 15	0,007
	9	1,68 (0,03); n = 18	1,54 (0,04); n = 17	0,010
	10	1,74 (0,04); n = 19	1,63 (0,03); n = 17	0,032
	6–10	2,30 (0,04); n = 14	2,10 (0,03); n = 9	0,002
T AUClog10 (SE)	6	1,26 (0,03)	1,03 (0,06)	0,002
	7	1,22 (0,04)	1,11 (0,08)	NS
	8	1,21 (0,04)	1,11 (0,07)	NS
	9	1,20 (0,05)	1,11 (0,07)	NS
	10	1,17 (0,05)	1,06 (0,06)	NS
	6–10	1,96 (0,04)	1,77 (0,06)	0,018

**Tab. 3.2.** Srovnání hormonálních hladin mezi těhotenstvím s mužským či ženským plodem. Srovnání Areas Under Curve (AUCs) bylo provedeno po transformaci log10. Standard error (SE) – směrodatná odchylka.

		<b>Závislé proměnné</b>						
<b>Nezávislé proměnné</b>		P	17-OHP	hCG	PAPP-A	E2	T	Prokrvení dominantního ovaria
Počet těhotenství (1 vs. > 1)	F	<b>7,3</b>	<b>6,4</b>	<b>5,1</b>	<b>3,6</b>	<b>3,9</b>	0,9	1,7
	p	<b>0,003</b>	<b>0,017</b>	<b>0,029</b>	<b>0,042</b>	<b>0,031</b>	0,363	0,199
Mateřská váha	F	2,0	2,1	0,4	4,0	0,03	0,1	0,6
	p	0,164	0,162	0,551	0,054	0,958	0,746	0,434
Mateřský věk	F	0,6	1,6	0,6	0,9	0,003	0,04	0,1
	p	0,456	0,211	0,458	0,339	0,958	0,849	0,706
Pohlaví plodu (ženské vs. mužské)	F	0,004	0,267	0,8	0,7	<b>8,7</b>	<b>11,0</b>	1,2
	p	0,953	0,610	0,374	0,418	<b>0,006</b>	<b>0,003</b>	0,280

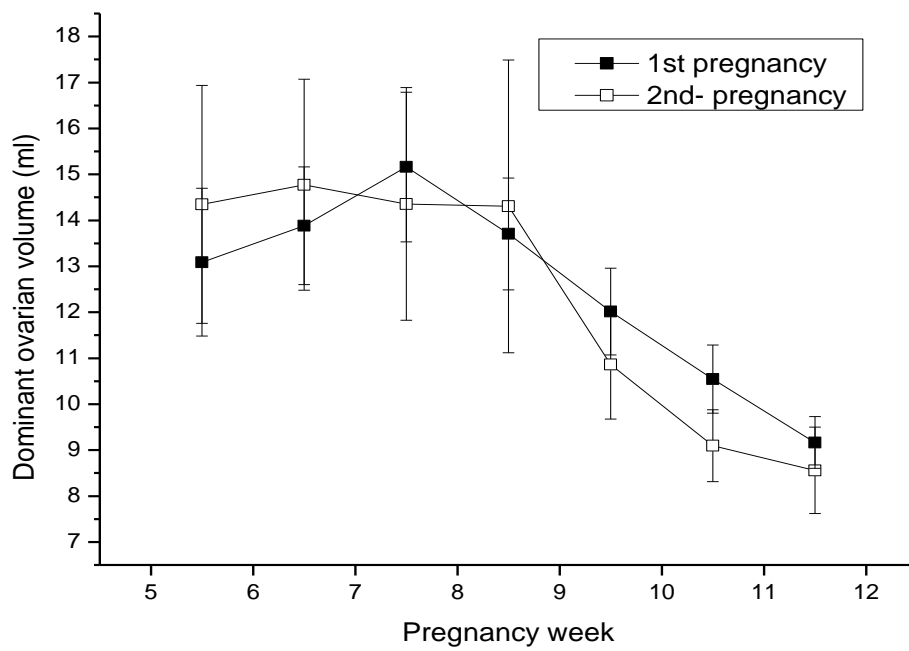
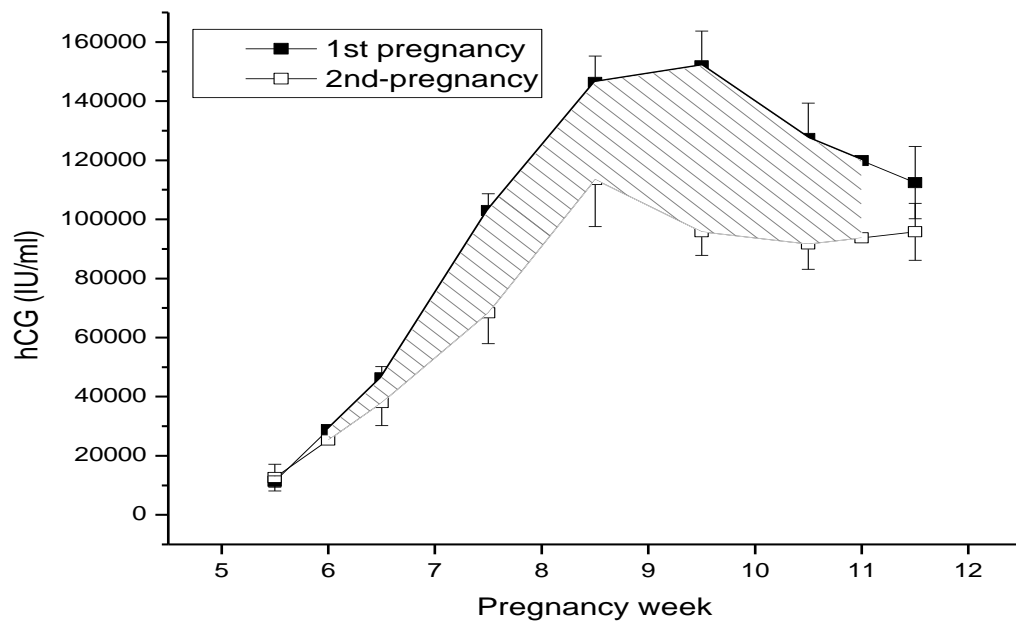
**Tab. 3.3.** Univariantní analýza (analýza rozptylu o jednom třídění) k zachycení efektu mateřských charakteristik a fetálního pohlaví na hladiny hormonů a ovariální prokrvení (F a p-value); hodnoty statisticky významné jsou zobrazeny tučně.

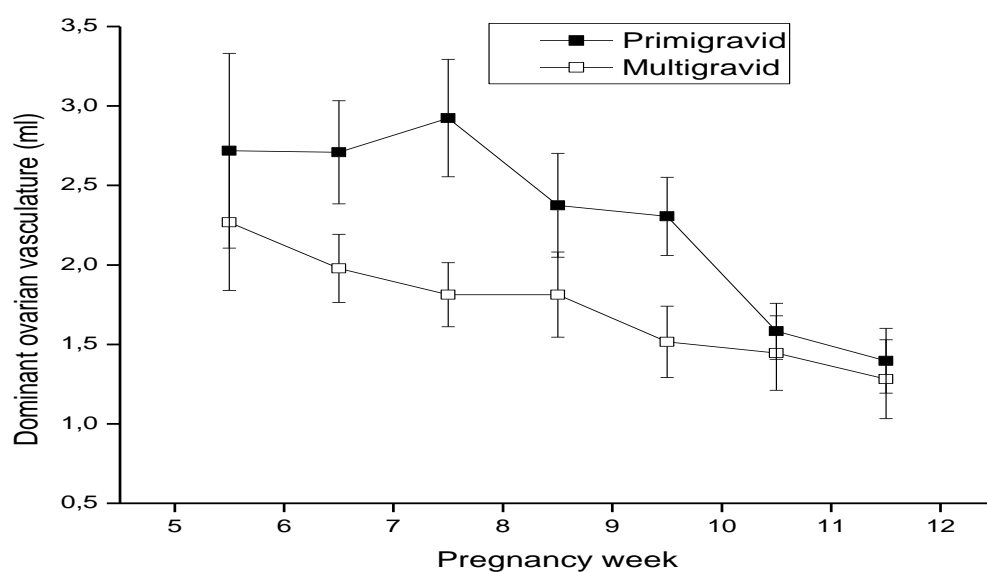
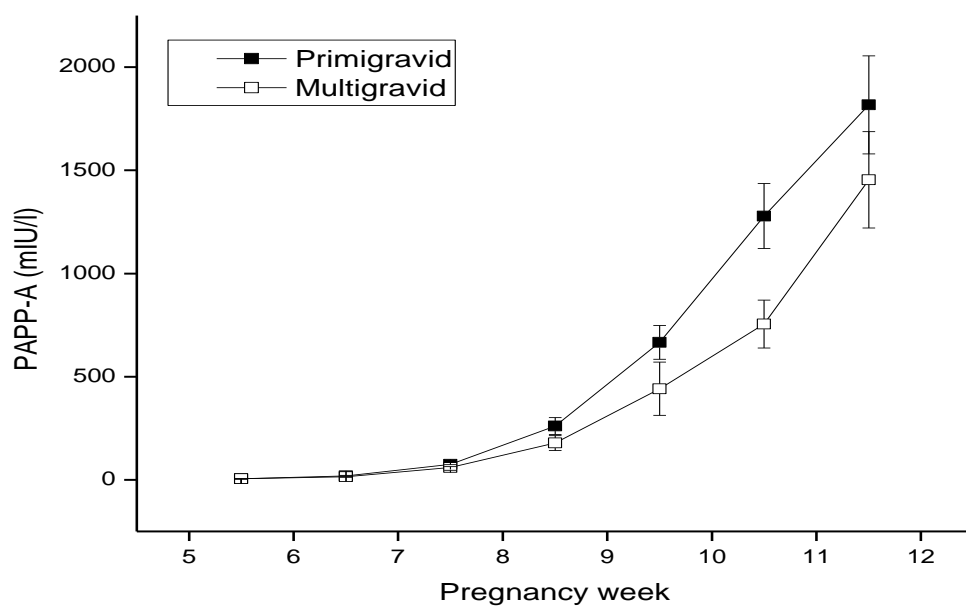




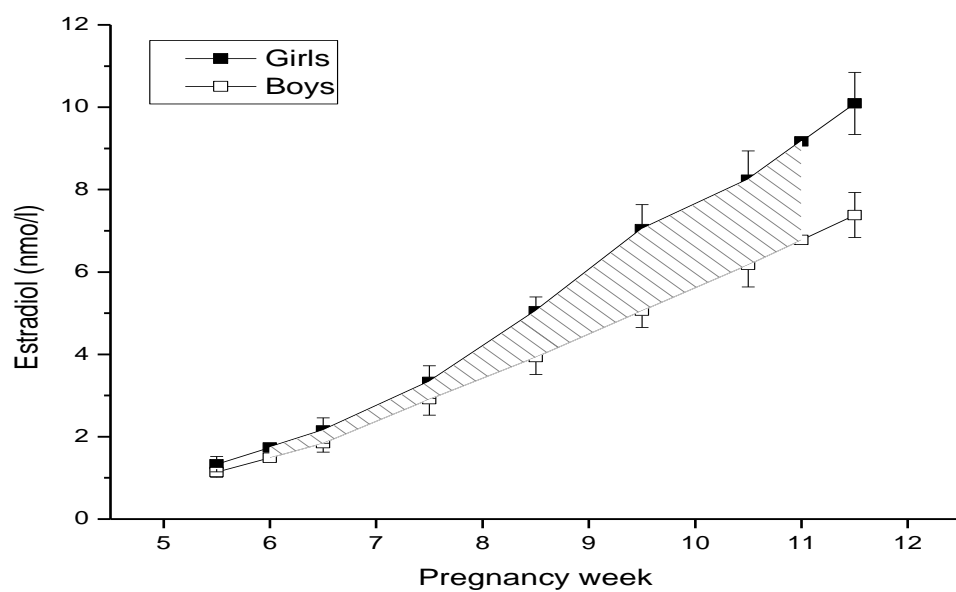
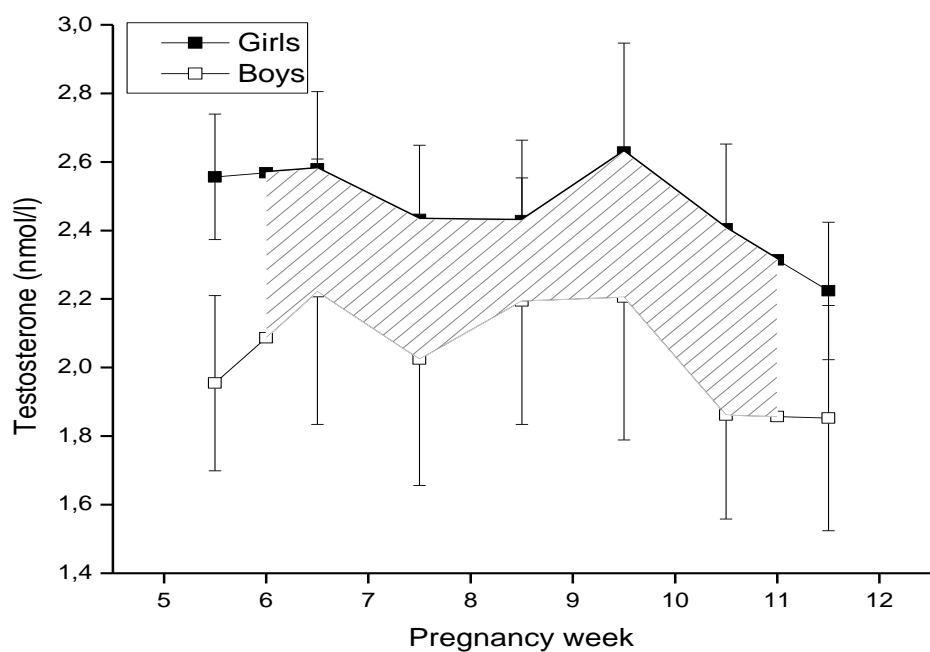
**Graf 1.** Střední hodnoty (boxes) a směrodatná odchylka SE (error bar) pro progesteron, 17-OH progesteron, testosteron a estradiol prezentovány pro primigravidy a multigravidy. Vyznačená pole prezentují statisticky významné rozdíly v AUCs (po transformaci log10 ) mezi oběma skupinami.







**Graf 2.** Střední hodnoty (boxes) a směrodatné odchylky SE (error bars) pro human chorionic gonadotrophin (hCG), pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), dominantní ovariální objem a dominantní ovariální prokrvení jsou prezentovány u primigravid a multigravid. Vyznačená pole prezentují statisticky významné rozdíly v AUCs (po transformaci log10) mezi oběma skupinami.



**Graf 3.** Střední hodnoty (boxes) a směrodatné odchylky SE (error bars) pro testosteron a estradiol prezentovány pro těhotenství jak s ženským, tak s mužským plodem. Vyznačená pole prezentují statisticky významné rozdíly v AUCs (po transformaci log10) mezi oběma skupinami, detailně v Tab. 3.2.

## 6. Diskuze

### **Využití a význam 3D ultrasonografie v predikci kvality a vývoje oocytu**

Protože frekvence výskytu ovariálních, děložních a jiných pánevních patologií u žen plánujících koncepci stále stoupá, je problematika ultrazvukového vyšetření reprodukčních poruch vysoce aktuálním tématem. Zhodnocení ovariální rezervy se stává v současnosti nepostradatelnou součástí vstupního vyšetření patientek s diagnózou primární i sekundární sterility. Vývoj v léčbě sterility metodami asistované reprodukce směřuje k přenosu jediného vysoce kvalitního embrya při zachování standardně vysoké úspěšnosti léčby. V této souvislosti ustupují v posledních letech do pozadí „standardní“ stimulační protokoly využívající vysokých dávek FSH často s vyšším počtem získaných oocytů. Na významu stále více nabývají tzv. měkké stimulační protokoly, jejichž cílem je menší počet rostoucích folikulů, které jsou však zdrojem vysoce kvalitních oocytů. Tento Natural/Mild IVF management (ISMAAR – International Society for Mild Approaches in Assisted Reproduction) vyžaduje, aby lékaři lépe porozuměli fyziologii folikulárního růstu a endometriální receptivitě. Ta může být spolehlivě vyšetřena 2D a 3D UZ, jak dokládají výsledky naší práce. Včasná identifikace vysoce kvalitních folikulů by mohla umožnit velmi včasnou selekci oocytů a embryí s nejvyšší vývojovou kompetencí a nadějí na úspěšnou implantaci. Definice nových aplikací 3D ultrazvuku v diagnostice žen zařazených do programu asistované reprodukce a ověření nových prediktivních faktorů při hodnocení kvality oocytů by tak mohla významně přispět do naší každodenní klinické praxe.

Prokrvení folikulu hraje hlavní roli během růstu a vývoje folikulu obsahující oocyt (15, 13). Nárůst perifolikulární angiogeneze během selekce dominantního folikulu a následném vzestupu hladiny LH či HCG může být zaznamenán pomocí měření perifolikulárního prokrvení/rychlosti průtoku. Toto dovoluje identifikaci folikulů s vysokou pravděpodobností produkovat kvalitní oocyty a následná embrya. 3D vizualizace povrchu ve čtyřnásobném zvětšení může zobrazit cévy ve folikulární stěně a identifikovat vzhled folikulu málo pravděpodobného v úspěšném získání kvalitního oocytu (9). Na významu nabývá při vyšetřování folikulární a ovariální vaskularity tzv. 3D power Doppler angiografie (3D PDA), zavádějící indexy (VI, FI, VFI), která umožňuje kvantifikovat ovariální vaskularitu v cílovém objemu.

AVC (Automatic Volume Calculation), nový softwarový program, identifikující a kvantifikující hypoechogenní oblasti v 3D souboru dat, umožňuje automatické zhodnocení jejich absolutní velikosti, středního průměru a objemu. Neomezený počet objemů může být takto kvantifikován a může být ideálním nástrojem pro zhodnocení ovariálního objemu a počtu antrálních folikulů (AFC) u žen podstupujících kontrolovanou ovariální stimulaci. Studie o významu 2D UZ power/color Doppler prokázaly korelace krevního prokrvení jednotlivých folikulů během léčby metodou IVF se ziskem oocytů (54), potenciálním vývojem oocytu (84), kvalitou embryí (54, 15) a počtem těhotenství (13).

Cílem naší studie bylo analyzovat vztah mezi druhem stimulačního protokolu (dlouhý protokol), příčinou sterility a zhodnotit prokrvení ovaria a kodominantního folikulu obou ovarii pomocí metody 3D UZ a PDA, stupeň perifolikulární vaskularity, PI a RI folikulární arterie vzhledem ke kvalitě získaného oocytu v prospektivní pilotní studii 17 žen zařazených do programu IVF/ICSI. Naše zjištění signifikantně vyššího počtu embryí kvality 1. v den ET, signifikantně většího flow indexu kodominantního folikulu pravého ovaria ve srovnání s výsledky měření levého ovaria, signifikantně častějšího zastoupení nejvyšší morfologické preimplantační kvality 1. a 2. embrya, která byla následně transferována ( $P = 0,029$ ;  $P = 0,020$ ) a častější výskyt kodominantního folikulu pravého ovaria s nejvyšším stupněm perifolikulárního prokrvení ve skupině otěhotněvších žen ( $P = 0,029$ ) korespondovala s výsledky předchozích literárních studií (54, 84, 13). Závěry ostatních ultrasonografických parametrů ve skupině těhotných a netěhotných žen byly nejednoznačné pravděpodobně z důvodu malého souboru dat. Budoucí výzkum s větším počtem pacientů může dosáhnout signifikantních závěrů, stanovení „cutoff“ hodnot perifolikulárního prokrvení a potvrzení těchto zjištění.

.

## **Zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu**

Selhání **implantace** zůstává hlavním důvodem nezdaru většiny léčby neplodnosti metodou IVF, vedoucí k vytoužené graviditě. Úspěšnost lidského embrya nidovat a vést v následnou graviditu tedy závisí na mnoha klinických a embryonálních faktorech a jejich interakcích, včetně věku ženy (68, 89), způsobu použité metody oplození oocytů (85, 68), vývojové fázi a kvality embrya určeného ke zmrazení (67, 71), míře poškození embryí po rozmrazení (20) a obnovení rozdělených blastomer po rozmrazení (86). Na druhé straně riziko ztráty těhotenství po KET je srovnatelné s rizikem ztráty těhotenství po ET z IVF nebo ICSI cyklů (4) a morfologie embrya není vztahována k počtu potratů v některém z léčebných modalit AR (88). Implantace embrya tedy závisí na dvou paralelních a pravděpodobně ovlivňujících se procesech. Jedná se jednak o **embryonální vývoj**, jenž se zdá být nejdůležitější a vede ke vzniku embrya vybaveného pro implantaci, jednak o **vývoj endometria**, ovlivňující děložní vnímavost neboli receptivitu. Děložní receptivita závisí na mnoha biochemických a strukturálních změnách odehrávajících se v endometriu v průběhu menstruačního cyklu. Cyklické cévní změny endometria včetně angiogeneze a vazodilatace objevující se v době „implantačního okna“ naznačují čas vztahující se k implantaci embrya. Tzv. „**implantační okno**“ je charakterizováno stavem zvýšené propustnosti cév, masivní angiogenezí endometria a snížením vaskulární rezistence. Výzkum těchto faktorů vedl k identifikaci periody dělohy, kdy dochází vlivem progesteronu k indukci tvorby **pinopodií** děložní sliznice, které absorbují z děložní dutiny tekutinu a reagují s blastocystou schopnou nidovat. V tomto období dochází k unikátní časové a prostorové expresi faktorů, které umožňuje embryu implantovat (prostřednictvím signalizace, apozice, adheze a invaze) v určitém časovém rozmezí 48 hodin, 7–10 dní po ovulaci. Identifikaci „okna implantace“ a její kvalitativní hodnocení u jednotlivých pacientů jasně potvrzují závažné klinické důsledky (30).

Nejvalidnější informaci o časném děložním růstu embrya poskytuje nepřímé stanovení hCG (lidský choriový gonadotropin), který je produkován trofoblastem plodu. Neporušený bílkovinný řetězec hCG podjednotek poprvé stanovíme (hCG > 0,015 ng/ml) v krvi a moči matek mezi 6. a 14. dnem po oplodnění. To platí zejména pro první postimplantační týden, který odpovídá nástupu procesu placentace (58). Zjištění pomalejšího růstu hCG podporuje hypotézu, že čas na implantaci embrya souvisí s kvalitou embrya (63).

Angiogeneze hraje důležitou roli v různých ženských reprodukčních procesech, jako je vývoj dominantního folikulu, tvorba žlutého tělíska, růst děložní sliznice a implantace. Dostatečný přívod krve k endometriu je obvykle považován za základní požadavek pro implantaci. Schopnost identifikovat receptivní dělohu pomocí neinvazivní metody může přinést neocenitelný klinický dopad na účinnost léčby a úspěch těhotenství. Pokud nereceptivní endometrium zhodnotíme před přenosem embrya, můžeme od tohoto cyklu upustit a embrya zavést v následném cyklu s příznivějšími podmínkami pro otěhotnění. Ultrazvukové vyšetření nám tedy nabízí možnost neinvazivního zhodnocení děložního prostředí před ET či KET/FET.

Současný pokrok v transvaginální 3D ultrasonografii nám umožňuje podrobně prozkoumat a zobrazit pánevní orgány, jednotlivé struktury a analyzovat jejich objemy s velkou přesností (1, 60). Je rozumné se domnívat, že analýza power Doppler signálu v určitém objemu (ROI) lépe odráží celkový stav prokrvení orgánu, než analýza (2D) dvoudimenzionálního UZ obrazu nebo měření rychlosti průtoku krve v jednom nebo několika cévách. Použitím 3D power Doppler ultrasonografie můžeme posoudit jak arteriální, tak žilní řečiště a pomocí počítačové analýzy učinit toto hodnocení objektivním (38). 3D ultrazvuk a power Doppler angiografie (3D UZ PDA) mají tedy výhodu současného posouzení objemu i prokrvení endometria (49).

K problematice UZ prediktivních faktorů endometriální receptivity lze nalézt v literatuře velmi rozdílná stanoviska. Několik předešlých studií pozorovalo přítomnost endometriální „triple line“ před embryo transferem jako příznivý prediktivní faktor, ačkoliv v těchto studiích byl ultrazvukový obraz endometria hodnocen po přenosu čerstvých embryí následující kontrolovanou ovariální stimulací (COH) (37, 12, 43, 69). Jiná práce hodnotící charakter endometria před FET naopak souvislost mezi přítomností endometriální „triple line“ a výsledkem cyklu nepotvrdila (55). Souvislost mezi výškou endometria a počtem těhotenství dosažených metodou AR popsal ve své práci Amir, kde výška endometria klesá v závislosti na věku pacientů v den podání HCG (2).

Cílem naší studie bylo zhodnocení některých endometriálních a ovariálních charakteristik před transferem rozmrazených embryí během spontánního menstruačního cyklu v predikci výsledků těhotenství po FET. Přes skutečnost rozdílné interpretace možností využití ultrasonografického vyšetření 3D PDA v hodnocení endometria byl pouze signifikantním nálezem ultrasonografický obraz endometriálního „triple line“ ve dnu FET u následně těhotných žen. V ostatních charakteristikách, jako jsou endometriální/subendometriální výška, objem či vaskularizace se pacientky neodlišovaly. Rovněž ani ultrasonografické charakteristiky dominantního ovaria a sérové hormonální hladiny neodlišovaly obě skupiny žen, které otěhotněly i těch, které neotěhotněly ve dnu FET.

O týden později po provedeném FET jsme pozorovali rozdílné změny v aktivitě corpus luteum u žen, které po FET otěhotněly oproti ženám, které zůstaly bez koncepce. Přítomnost endometriálního UZ obrazu „triple line“ ve dnu FET významně souvisela s výsledkem FET cyklu, tedy následným otěhotněním. Endometriální „triple line“ tedy odráží proliferaci endometria a jeho nepřítomnost může naznačovat předčasné sekreční změny endometriální sliznice (8). U převážné většiny našich pacientek byla endometriální „triple line“ stále viditelná při ultrazvukovém vyšetření o týden po FET, tedy 10 dní po pozitivním provedeném LH testu, potvrzujícím proběhlou ovulaci. V této době, době střední luteální fáze, corpus luteum aktivně produkuje progesteron. Navíc u všech pacientek byla prováděna suplementace progesteronem, která má zajistit, aby v případě corpus luteální insuficience byla udržena dostatečná koncentrace progesteronu potřebná k udržení gravidity. Podle dřívějších zjištění obraz „triple line“ by měl obvykle zmizet během sekreční fáze pod vlivem sekrece progesteronu (23). Je tedy možné, že pokud by bylo druhé vyšetření v naší studii prováděno později během sekreční fáze, byla by přítomnost UZ obrazu „triple line“ nižší.

Naším cílem bylo zhodnotit, zda 3D power Doppler ultrasonografie může nabídnout měření a hodnocení předpovídající šance pacientek na těhotenství po FET. Protože tato technika umožňuje přesné posouzení objemu určitého orgánu a prokrvení zásobující daný orgán, měřili jsme objem endometria, subendometria, dominantního ovaria a jeho prokrvení před FET. Výsledky ukázaly, že tato technika však nebyla schopná rozlišovat mezi úspěšným a neúspěšným cyklem a neměla by být určena pro tento účel. To je v souladu s dřívějším pozorováním některými autory ve studiích po transferu čerstvých embryí následující COH (34, 43, 77).

Nebyl prokázán žádný rozdíl v tloušťce endometria mezi ženami, které otěhotněly a nikoliv, v souladu s obecně známou skutečností, že měření tloušťky endometria nemůže být používáno v predikci pravděpodobnosti následné koncepce (24).

Byly prokázány jasné známky změn v aktivitě corpus luteum ve vztahu k následnému těhotenství. U pacientek, které otěhotněly, 17-OHP a E2 se zvýšil, což odráží „záchranu“ žlutého tělíska pomocí hCG produkovaného z tkáně trofoblastu (35). Naopak u pacientek, které neotěhotněly, dominantní ovariální objem klesl při druhém měření a hladiny 17-OHP byly nižší než u těhotných žen, což odráží pokračující regresi corpus luteum bez hCG stimulace. Hladina progesteronu vzrostla u obou skupin žen, což bylo zřejmě způsobeno exogenní suplementací progesteronem k podpoře udržení potřebné hladiny P při insuficientní luteální fázi. Je také velmi nepravděpodobné, že by porucha cyklu



FET byla důsledkem nízké úrovně hladiny progesteronu, protože nebyl pozorován žádný rozdíl v těchto hladinách u obou skupin žen, které otěhotněly i těch, které neotěhotněly.

V současné literatuře je pozornost vztahována k možnému **vztahu mezi stupněm echogenity endometria a výsledkem IVF- ET cyklů**. Někteří autoři rozdělili cykly do šesti skupin podle stoupajícího rozsahu hyperechogenní transformace endometria. Oproti stejnorodosti v jednotlivých případech kontrolované ovariální hyperstimulace (COH) a rozdílné embryogeneze byl pozorován dramatický pokles v klinickém a pokračujícím těhotenství stejně jako v počtu implantací ve skupině s nejnižší až po skupinu s nejvyšší endometriální echogenitou. Naopak nebyl pozorován žádný vztah mezi tloušťkou endometria a výsledkem IVF- ET cyklu v den podání hCG (21). Tento ultrasonografický aspekt může odrážet přítomnost přímého vedení žláz, sníženou glandulární sekreci a snížený edém stromatu, charakterizující proliferální endometrium. Software 3D ultrasonografického přístroje dovoluje stanovit echogenitu tkáně na základě vyhodnocení střední škály šedi v oblasti zájmu našeho měření (ROI). Použití této modality bylo popsáno v předchozích studiích velmi vzácně (37). Vzhledem k tomu, že echogenita sekrečního endometria je obvykle vyšší než v okolním myometriu, hodnotili jsme echogenitu v těchto dvou oblastech subjektivně a zároveň použili software pro výpočet hodnoty MG (střední šedi). Byla pozorována silná korelace mezi těmito dvěma metodami. Budoucí studie ukáže, zda má tento korelační index klinickou hodnotu.

## Vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství

Podle měření dřívějších studií se zdá, že počet předchozích těhotenství a porodů může ovlivňovat hladinu mateřského hCG během probíhajícího těhotenství. Primigravidy vykazují vyšší hladiny hCG, zejména v průběhu druhého trimestru těhotenství (90, 5, 80, 3), ačkoli během pozdních týdnů prvního trimestru (9–14 týden) byly výsledky rozporuplné (73, 19, 14). Nejen rozdíly v sekreci hCG, ale také v placentární sekreci pregnancy-associated plasma proteinu A (PAPP-A) a estradiolu (E2) byly pozorovány u primigravid a multigravid (3, 6, 91, 40, 64). Kromě toho může ovlivnit pohlaví plodu sekreci placentárních hormonů. Některé studie (19, 92) ukázaly, že ženy s těhotenstvím ženského pohlaví plodu mají vyšší hladiny hCG v 9.–14. týdnu těhotenství oproti těhotenstvím s plody mužského pohlaví. Také hladiny PAPP-A byly údajně vyšší u žen očekávajících dívky než u žen nosících mužský plod (44). To bylo zpochybněno jinými autory (19, 92, 74). Nicméně nebyly shledány žádné rozdíly v hladinách E2 a P během prvního trimestru v souvislosti s pohlavím plodu (45). Literatura neposkytuje mnoho informací o vztahu mezi paritou, pohlavím plodu a sekrecí těchto hormonů v průběhu raného těhotenství. Navíc většina z dosud publikovaných informací pochází z „cross-sectional“ studií.

Naše pozorování ukázala následující: za prvé, že parita ovlivňuje funkci placenty a žlutého tělíska během 5.–11. týdne těhotenství, za druhé, že fetální pohlaví má vliv na mateřskou hladinu testosteronu a estradiolu.

Vyšší sekrece **hCG** pozorována u primigravid během 6.–10. týdne těhotenství nebyla dříve zaznamenána. Dřívější studie se zabývaly především hladinou hCG během prvního trimestru a výsledky byly rozporuplné (73, 19, 14). Spencer prováděl skríníng Down syndromu během 10–14. týdne a zaznamenal, že těhotenství a parita byla spojena s malým, ale postupným zvyšováním hodnoty hladiny volného  $\beta$ -hCG v séru (74). De Graaf nenašel žádnou změnu v hladině sérového volného  $\beta$ -hCG ve vztahu k paritě během 9.–13. týdne těhotenství (19). Ve shodě s našimi závěry zaznamenal Chen u pacientek mezi 6.–15. týdnem u multipar významně nižší hladiny hCG (14). Několik studií, ve kterých ženy podstoupily skríníng pro Downův syndrom, ukázalo, že existuje negativní korelace mezi multiparitou a hladinou hCG během druhého trimestru těhotenství (90, 16, 27, 51). Rozdíl mezi hladinou hCG u primigravid a multigravid či primipar a multipar byl méně než 10 % po korekci hmotnosti, jejíž vliv na provedení skríníngu Downova syndromu byl považován za zanedbatelný.

Navzdory výsledkům několika dřívějších studií není známo racionální vysvětlení pro pokles sekrece hCG během pozdního těhotenství a zůstává otázkou vyžadující dalšího zkoumání.

V obou skupinách primigravid a multigravid hCG sekrece od 5. do 8.–9. týdne rychle vzrostla a následně se postupně snižovala ke konci prvního trimestru těhotenství. Podle některých autorů sekrece hCG přímo souvisí s množstvím produkovaného hCG tkání syncytiotrofoblastu. Pokles sekrece hCG odráží morfologické změny placenty z orgánu určeného k invazi do orgánu převodu (28). Hladiny sekrece E2 a PAPP-A během 5.–11. týdne těhotenství skupinu primigravid a multigravid nerozlišovaly. V předchozích studiích byla pozorována zvýšená hladina E2 a PAPP-A u nulipar později během průběhu těhotenství (3, 6, 91, 40, 64). Někteří autoři spekovali s myšlenkou možné indukce zvýšení činnosti 16 $\alpha$ -hydroxylázy v mateřských játrech multipar předchozím těhotenstvím, která může vést k navýšení mateřského metabolismu estradiolu a tím i jeho nižší systémové koncentraci (53).

V souvislosti s vyšší sekrecí hCG, naměřenou u primigravid, bylo zjištěno i zvýšení corpus luteální aktivity neboť sekrece obou hormonů **P a 17-OHP** byla u primigravid vyšší. Hladina P u primigravid byla vyšší již v 7. týdnu, o čemž svědčí zvýšení corpus luteální aktivity spíše než zvýšení placentární sekrece, protože luteoplacentální „shift“ nastává v 7.–8. týdnu těhotenství. Pro ještě silnější důkazy o zvýšené corpus luteální činnosti svědčí zjištění, že produkce 17-OHP byla vyšší u primigravid během následného období 6.–10. týdne těhotenství. Tento hormon je považován za produkt pouze corpus luteum v časně fázi těhotenství (83), což znamená, že odráží corpus luteální aktivitu. V důsledku toho se může zdát, že zvýšené vylučování hCG placentou u primigravid má za následek vyšší corpus luteální činnost během prvního trimestru těhotenství. Statistická analýza nicméně nepotvrdila mezi oběma skupinami primigravid a multigravid významný rozdíl v prokrvení CL, které úzce souvisí s jeho hormonální sekrecí (36, 34, 56, 50, 57).

Těhotenství s plody ženského pohlaví překvapivě prokázaly vyšší hladiny mateřského estradiolu a testosteronu než těhotenství s mužskými plody. V této fázi těhotenství se předpokládá, že jsou hormonálně aktivní pouze varlata mužských plodů, nikoliv však vaječníky plodů ženských. Fetální varlata začínají produkovat testosteron po 7. týdnu těhotenství a nejvyšší úroveň sekrece dosáhnou v 11.–14. týdnu gravidity. Poté jejich sekreční činnost klesá (78). Diferenciace ženského pohlaví nezávisí na ovariálních hormonech na rozdíl od diferenciace mužského pohlaví. Varlata vyvolají mužskou pohlavní diferenciaci prostřednictvím produkce anti-Mulleriánského hormonu, inzulin-like faktorů a androgenů (32). V důsledku toho by bylo možné očekávat, že těhotenství s mužským plodem bude mít vyšší koncentrace steroidů než těhotenství s plodem ženského pohlaví. Je tedy pravděpodobné, že fetální gonády neprodukují

významné množství steroidů do oběhu matky a rozdíly zde pozorované s největší pravděpodobností pocházejí z placenty a žlutého tělíska.

Dřívější studie zjistily rozdíly související s pohlavím plodu, zejména v hCG sekreci, v prvním trimestru těhotenství (19, 91, 44), ale žádná studie nezaznamenává rozdíly v sekreci E2 či testosteronu (45, 73). Na rozdíl od některých autorů, kteří měřili nižší hladiny P v těhotenství s plodem ženského pohlaví v 16. a 27. týdnu (90), nenalezli jsme žádné rozdíly v sekreci progesteronu mezi oběma pohlavími. Nebyly zjištěny ani rozdílné hladiny PAPP-A v závislosti na pohlaví plodu, což je ve shodě s výsledky několika (19, 91, 73), nikoliv všech předchozích studií (44).

## **Luteoplacentární shift. Placentární kompetence a suplementace těhotenství u funkčně agonadálních žen těhotných po léčbě metodami asistované reprodukce**

V časném těhotenství je nejvýznamnějším hormonem vylučovaným trofoblastickou tkání placenty hCG, který „zachrání“ corpus luteum před involucí s cílem zachovat syntézu a sekreci progesteronu (11). Doba života CL se tak prodlouží cca na 12 týdnů. Produkce hCG se zvyšuje až do okamžiku, kdy se placenta v 7.–8. týdnu těhotenství stane hlavním zdrojem syntézy progesteronu a nastává **tzv. luteoplacentární shift** (11, 36). V 10.–11. týdnu gravidity hladina hCG začíná klesat, což je považováno za znamení morfologických změn probíhajících v placentě. Od 20. týdne těhotenství produkce hCG postupně znovu stoupá do termínu porodu (28).

Informace o průběhu a vztahu hladin hCG, estrogenů a progesteronu v časném těhotenství jsou zásadní pro pochopení jejich významu pro normální vývoj těhotenství a funkci fetoplacentární jednotky. Tulchinsky sledoval kontinuálně hladiny steroidů u 10 těhotných žen (82). Kontinuální vzestup sekrece estradiolu od 5. týdne gravidity je dokladem sekrece estrogenů placentou, která postupně sníží koncentrace LH a aktivitu luteální 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy, konvertující pregnenolon na progesteron (25). Tento vzestup jsme prokázali i my v souladu s dalšími autory (76,48), nicméně sekrece estradiolu (log<sub>10</sub> AUC) byla v našem měření u primigravid a multigravid v 5.–9. týdnu obdobná. Z našeho měření (**Graf 1**) je rovněž patrný signifikantní vzestup hladin progesteronu od 7. týdne těhotenství, což je dokladem postupného nárůstu podílu fetoplacentární jednotky v produkci progesteronu.

Odlišný průběh hladin progesteronu můžeme očekávat u žen těhotných po léčbě metodou IVF. V těhotenství po IVF vlivem přítomnosti mnohočetných CL nastává postupný pokles v suprafyziologických hladinách progesteronu, související s poklesem činnosti mnohočetných CL graviditatis. Tato činnost je však během prvních čtyř měsíců těhotenství natolik výrazná, že maskuje sekreční aktivitu fetoplacentární jednotky (48). Patofyziologie dysfunkce corpus luteum v gonadotropin stimulovaných cyklech byla připisována jednak suprafyziologickým koncentracím estradiolu, které mohou způsobit předčasnou regresi CL pravděpodobně tím, pravděpodobně tím že sníží koncentrace LH a aktivitu luteální 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy, konvertující pregnenolon na progesteron (25). Tato skutečnost nutně navozuje otázku vhodnosti dávkování a doby suplementace P či hCG pro podporu luteální fáze v časném těhotenství po

IVF ovariální stimulaci. Nicméně protože jsou deklarovány spojitosti mezi podáním hCG a OHSS, podpora luteální fáze choriogonodotropinem byla v širší míře nahrazena vaginální formou mikronizovaného progesteronu ve formě gelu či kapslí (31).

Poslední trend AR směřuje k přenosu jediného vysoce kvalitního embrya při zachování standardně vysoké úspěšnosti léčby. V této souvislosti na významu nabývá tzv. minimální stimulace, mající za cíl zvýšit efektivnost stimulačního cyklu při co nejnižší hormonální zátěži pacientky. Podle ověřené skutečnosti zvyšující se dávky LH či podaného hCG mohou zabránit funkční luteolýze. Nicméně je naznačeno, že působením některých faktorů corpus lutea po expozici HCG, jako je progesteron, estradiol, VEGF může být ovlivněn proces endometriální apoptozy při regresi žlutého tělíska (17). Tyto poněkud nekorespondující skutečnosti otevírají diskuze týkající se vhodnosti dávky hCG, spouštějící ovulaci v minimální stimulaci, či otázky hormonální suplementace během luteální fáze IVF cyklu. Z těchto důvodů by měla být role hCG v alternativní léčbě podpory luteální fáze po IVF stimulaci také přehodnocena.

Znalost hormonálních hladin steroidů produkovaných CL a následně placentou v 5.–11. týdnu těhotenství po spontánní koncepci může s přesností určit dávkování a nezbytnou délku hormonální suplementace v raném těhotenství u žen s primárním či sekundárním ovariálním selháním, tj. funkčně agonadálních žen. První zpráva o těhotenství po embryotransferu s embryi z darovaných oocytů byla zaznamenána v roce 1983 (81). Hormonální substituční terapie (HRT) po terapii darovanými oocyty u agonadálních žen bylo nejprve využito k udržení těhotenství (46) a těhotenství bylo poprvé potvrzeno u postmenopauzálních žen při užití podobných metod podle Serhala a Crafta 1989 (69).

K problematice nezbytné délky hormonální suplementace a nástupu plné placentární kompetence v těchto těhotenstvích lze nalézt v literatuře rozdílná stanoviska. Salat-Baroux ukončoval suplementaci v 10. týdnu gravidity, udává však, že z analýzy průběhu hladin estradiolu a progesteronu nelze vyloučit, že placentární kompetence (luteoplacentální shift) nastupuje již dříve (65). Mardešić popisuje, že vysazení hormonální podpory v 15. týdnu těhotenství nikdy nezpůsobilo ohrožení těhotenství funkčně agonadálních žen (48). Z našeho měření zaměřeného především na porovnání jednotlivých hladin luteálních hormonů a placentární sekreci ve vztahu k paritě a pohlaví plodu, prováděného od 5.–11. týdne těhotenství, můžeme usuzovat podle charakteru křivek koncentrací jednotlivých hormonů na potřebné hladiny těchto působků k udržení těhotenství. Na řadu otázek spojených s problematikou placentární kompetence a suplementace těhotenství funkčně agonadálních žen však stále hledáme odpověď a vhodnost délky suplementace dávkování steroidů vyžaduje další studie.

## 7. Závěry

### **Využití a význam 3D ultrasonografie v predikci kvality a vývoje oocyту**

Zhodnocení perifolikulární vaskularity a ovariálního prokrvení pomocí 3D power Doppler angiografie (PDA) může prezentovat možné prediktivní vyšetření ve zhodnocení pravděpodobnosti získání kvalitního oocyту a následně dobře se vyvíjejícího embrya. V budoucím výzkumu s větším počtem respondentů je třeba potvrdit tyto signifikantní závěry.

### **Zhodnocení ovariálních a endometriálních charakteristik pomocí 3D power Doppler ultrasonografie v predikci výsledků po FET cyklu**

Výsledky studie prezentují možnost pozitivního ovlivnění úspěšnosti těhotenství po FET pomocí neinvazivních vyšetření. Přítomnost ultrasonografického obrazu endometriální „triple line“ ve dnu FET můžeme pokládat za pozitivní prediktor dosažení těhotenství po provedeném přenosu rozmrazených embryí. Tato studie jako první publikuje význam detekce aktivovaného žlutého tělíska v těhotenství již v prvním týdnu po provedení FET (vzestup hladiny 17-OHP a estradiolu u těhotných oproti poklesu hladiny 17-OHP a objemu dominantního ovaria u žen, které neotěhotněly). Měření power Doppler indexů metodou 3D PDA není ve dnu FET přínosem pro predikci úspěšnosti po provedeném FET. Nicméně, abychom mohli potvrdit skutečný význam těchto poznatků a stanovit hraniční hodnoty pro endometriální objem, výšku a vaskularizační indexy, potřebovali bychom provést studii s větším počtem participujících pacientek.

## **Vliv parity a fetálního pohlaví na hormonální sekreci corpus luteum a placenty během prvního trimestru těhotenství**

Rozdílnou míru funkce placenty, odrážející funkci corpus luteum, můžeme pozorovat mezi primigravidami a multigravidami již během prvních týdnů těhotenství. Pohlaví plodu ovlivňuje hladinu mateřského E a T. Nebyl shledán rozdíl v pohlaví či váze novorozence mezi skupinou primigravid a multigravid. Naše sledování těhotenství mezi 5. a 11. týdnem prokázala, že počet předchozích těhotenství a pohlaví plodu probíhajícího těhotenství ovlivňuje placentární sekreci mateřských hormonů a funkce corpus luteum.

## **Luteoplacentární shift. Placentární kompetence a suplementace těhotenství u funkčně agonadálních žen těhotných po léčbě metodami asistované reprodukce**

Znalost hormonálních hladin steroidů produkovaných CL a následně placentou v 5.–11.týdnu těhotenství po spontánní koncepci může s přesností určit dávkování a nezbytnou délku hormonální suplementace v raném těhotenství u žen s primárním či sekundárním ovariálním selháním, tj. funkčně agonadálních žen. Otázky spojené s problematikou placentární kompetence a suplementace těhotenství funkčně agonadálních žen však stále navozují řadu odpovědí a vhodnost délky suplementace dávkování steroidů vyžaduje další studie.



## 8. Seznam zkratek

**AR** – assisted reproduction

**ART** – assisted reproductive technology

**COH** – controlled ovarian hyperstimulation

**KET** – kryoembrotransfer

**FET** – frozen embryo transfer

**3D UZ** – three-dimensional ultrasound

**3D TVUS** – 3D transvaginal ultrasonography

**3D PDA** – 3D power Doppler angiography

**VOCAL** – imaging program (Virtual Organ Computer Aided Analysis)

**VI** – vascularization index

**FI** – flow index

**VFI** – vascularization flow index

**MG** – mean gray value

**IVF** – fertilization in vitro

**ICSI** – intracytoplasmic sperm injection of eggs

**OPU** – ovum pick up

**T** – testosterone

**E2** – estradiol

**PAPP-A** – pregnancy associated plasma protein A

**17-OHP** – 17-OH progesteron

**P** – progesteron

**hCG** – human chorionic gonadotropin

**LH** – luteinizing hormone

## 9. Seznam použité literatury

1. Alcazar JL. Three-dimensional ultrasound assessment of endometrial receptivity: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006 Nov; 9(4), p. 56.
2. Amir W, Micha B, Ariel H, Liat LG, Jehoshua D, Adrian S. Predicting factors for endometrial thickness during treatment with assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2007 Apr; 87(4), p. 799–804.
3. Arslan AA, Zeleniuch-Jacquotte A, Lukanova A, Afanasyeva Y, Katz J, Levitz M, Del Priore G and Toniolo P. Effects of parity on pregnancy hormonal profiles across ethnic groups with a diverse incidence of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15, p. 2123–2130.
4. Aytoz A, Van den Abbeel E, Bonduelle M, Camus M, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1999 Oct; 14(10), p. 2619–2624.
5. Barkai G, Goldman B, Ries L, Chaki R and Cuckle H. Effect of gravidity on maternal serum markers for Down's syndrome. *Prenat Diagn* 1996; 16, p. 319–322.
6. Bernstein L, Lipworth L, Ross RK and Trichopoulos D. Correlation of estrogen levels between successive pregnancies. *Am J Epidemiol* 1995; 142, p. 625–628.
7. Bourne TH, Jurkovic D, Waterstone J, Campbell S, Collins WP. Intrafollicular blood flow during human ovulation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1991 Jan 1; 1(1), p. 53–59.
8. Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update* 2003; 9(6), p. 515–522.
9. Campbell S. The role of advanced ultrasound in the management of natural/mild ART, *Proceedings of The Third World Congress on Mild Approaches in Assisted Reproduction – embracing Mild IVF and IVM*, Venue: Pacifico Yokohama, Japan, July 30 and 31, 2010. abst. book. p. 31.
10. Csapo AI and Pulkkinen M. Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy. Luteectomy evidence. *Obstet Gynecol Surv*. 1978; 33, p. 69–81.
11. Csapo AI, Pulkkinen MO, Wiest WG. Effects of luteectomy and progesterone replacement therapy in early pregnant patients. *Am J Obstet Gynecol*. 1973 Mar 15; 115(6), p. 759–765.

12. Coulam CB, Bustillo M, Soenksen DM, Britten S. Ultrasonographic predictors of implantation after assisted reproduction. *Fertil Steril* 1994; 62(5), p. 1004–1010.
13. Coulam CB, Goodman C, Rinehart JS. Colour Doppler indices of follicular blood flow as predictors of pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1999 Aug; 14(8), p. 1979–1982.
14. Chen T, Lundin E, Grankvist K, Zeleniuch-Jacquotte A, Wulff M, Afanasyeva Y, Schock H, Johansson R, Lenner P, Hallmans G, Wadell G, Toniolo P, Lukanova A. Maternal hormones during early pregnancy: a cross-sectional study. *Cancer Causes Control.* 2010 May; 21(5), p. 719–727.
15. Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW. Follicular vascularity – the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in- vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod.* 1997 Jan; 12(1), p. 191–196.
16. Daniel DG, Reynolds T and Penney MD. Calculation of Down's syndrome risk. *Lancet* 1994; 343(8895), p. 490.
17. Devoto L, Kohen P, Muñoz A, Strauss JF 3rd. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18(2), p. 19–24.
18. Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, González RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF. Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Jan 25; 186(2), p. 137–141.
19. De Graaf IM, Cuckle HS, Pajkrt E, Leschot NJ, Bleker OP and van Lith JM. Co-variables in first trimester maternal serum screening. *Prenat Diagn* 2000; 20, p.186–189.
20. Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 2000 Jan; 15(1), p. 175–179.
21. Fanchin R. Assessing uterine receptivity in 2001: ultrasonographic glances at the new millennium. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Sep; 943, p. 185–202.
22. Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, Duncan WC. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jan; 90(1), p. 427–434.
23. Forrest TS, Elyaderani MK, Muilenburg MI, Bewtra C, Kable WT, Sullivan P. Cyclic endometrial changes: US assessment with histologic correlation. *Radiology* 1988, 167(1), p. 233–237.
24. Friedler S, Schenker JG, Herman A, Lewin A. The role of ultrasonography in the evaluation of endometrial receptivity following assisted reproductive treatments: a critical review. *Hum Reprod Update* 1996; 2(4), p. 323–335.

25. Fatemi HM, Popovic-Todorovic B, Papanikolaou E, Donoso P, Devroey P. An update of luteal phase support in stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Update*. 2007 Nov–Dec; 13(6), p. 581–590.
26. Gritzky A, Brandl H. The Voluson (Kretz) technique. In *3D Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, Mertz E (ed.). Lippincott Williams & Wilkins Healthcare: Philadelphia, PA 1998, p. 9–15.
27. Haddow JE, Palomaki GE and Knight GJ. Effect of parity on human chorionic gonadotrophin levels and Down's syndrome screening. *J Med Screen* 1995; 2, p. 28–30.
28. Hay DL. Placental histology and the production of human choriogonadotrophin and its subunits in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95, p. 1268–1275.
29. Hazzard TM, Stouffer RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000 Dec; 14(6), p. 883–900.
30. Hoozemans DA, Schats R, Lambalk NB, Homburg R, Hompes PG. Serial uterine artery Doppler velocity parameters and human uterine receptivity in IVF/ICSI cycles. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Apr; 31(4), p. 432–438.
31. Hubayter ZR, Muasher SJ. Luteal supplementation in in vitro fertilization: more questions than answers. *Fertil Steril*. 2008 Apr; 89(4), p. 749–758.
32. Hughes IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology* 2001; 142, p. 3281–3287.
33. Järvelä IY, Sladkevicius P, Tekay AH, Campbell S, Nargund G. Intraobserver and interobserver variability of ovarian volume, gray - scale and color flow indices obtained using transvaginal three - dimensional power Doppler ultrasonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21(3), p. 277–282.
34. Järvelä IY, Sladkevicius P, Kelly S et al. Evaluation of endometrial receptivity during in-vitro fertilization using three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005 Dec; 26(7), p. 756–759.
35. Järvelä IY, Niinimäki M, Martikainen H, Ruokonen A, Tapanainen JS. Ovarian response to the human chorionic gonadotrophin stimulation test in normal ovulatory women: the impact of regressing corpus luteum. *Fertil Steril*. 2007 May; 87(5), p. 1122–1130.
36. Järvelä IY, Ruokonen A, Tekay A. Effect of rising hCG levels on the human corpus luteum during early pregnancy. *Hum Reprod*. 2008 Dec; 23(12), p. 2775–2781.

37. Järvelä IY, Mason HD, Sladkevicius P, Kelly S, Ojha K, Campbell S, Nargund G. Characterization of normal and polycystic ovaries using three-dimensional power Doppler ultrasonography. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(12), p. 582–590.
38. Jokubkiene L, Sladkevicius P, Rovas L, Valentin L. Assessment of changes in endometrial and subendometrial volume and vascularity during the normal menstrual cycle using three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006 Jun; 27(6), p. 672–679.
39. Kan A, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Perifollicular vascularity in poor ovarian responders during IVF. *Hum Reprod*. 2006 Jun; 21(6), p. 1539–1544.
40. Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS and Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31, p. 493–502.
41. Kondo I, Suganuma N, Ando T, Asada Y, Furuhashi M, Tomoda Y. Clinical factors for successful cryopreserved-thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*. 1996 Mar; 13(3), p. 201–206.
42. Killick SR. Ultrasound and the receptivity of the endometrium. *Reprod Biomed Online* 2007 Jul; 15(1), p. 63–67.
43. Kupesic S, Bekavac I, Bjelos D, Kurjak A. Assessment of endometrial receptivity by transvaginal color Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasonography in patients undergoing in vitro fertilization procedures. *J Ultrasound Med* 2001; 20(2), p. 125–134.
44. Larsen SO, Wojdemann KR, Shalmi AC, Sundberg K, Christiansen M and Tabor A. Gender impact on first trimester markers in Down syndrome screening. *Prenat Diagn* 2002; 22, p. 1207–1208.
45. Lutterodt M, Byskov AG, Skouby SO, Tabor A and Yding Andersen C. Anti-Müllerian hormone in pregnant women in relation to other hormones, fetal sex and in circulation of second trimester fetuses. *Reprod Biomed Online* 2009; 18, p. 694–699.
46. Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C, Renou P. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984 Jan; 307(5947), p. 174–175.
47. Makker A, Singh MM. Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility. *Med Res Rev* 2006 Nov; 26(6), p. 699–747.

48. Mardešić T, Hulvert J, Miková M, Müller P, Vobořil J, Hüttelová R, Bečvářová V. [Hormone replacement for pregnancy in functionally agonadal women after transfer of thawed embryos in the in vitro fertilization program-problems of placental incompetence]. *Ceska Gynekol.* 1998 Oct; 63(5), p.402–405.
49. Merce LT, Barco MJ, Bau S, Troyano J. Are endometrial parameters by three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography related to in vitro fertilization/embryo transfer outcome. *Fertil Steril* 2008 Jan; 89(1), p. 111–117.
50. Miyazaki T, Tanaka M, Miyakoshi K, Minegishi K, Kasai K, Yoshimura Y. Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. *Hum Reprod.* 1998 Oct; 13(10), p. 2836–2841.
51. Mooney RA, Arvan DA, Saller DN Jr, French CA and Peterson CJ. Decreased maternal serum hCG levels with increasing gravidity and parity. *Obstet Gynecol* 1995; 86, p. 900–905.
52. Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet.* 2008 May; 25(5), p. 183–186.
53. Musey VC, Collins DC, Brogan DR, Santos VR, Musey PI, Martino-Saltzman D and Preedy JR. Long term effects of a first pregnancy on the hormonal environment: estrogens and androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64, p. 111–118.
54. Nargund G, Doyle PE, Bourne TH, Parsons JH, Cheng WC, Campbell S, Collins WP. Ultrasound derived indices of follicular blood flow before HCG administration and the prediction of oocyte recovery and preimplantation embryo quality. *Hum Reprod.* 1996 Nov; 11(11), p. 2512–2517.
55. Ng EH, Chan CC, Tang OS, Yeung WS, Ho PC. The role of endometrial and subendometrial vascularity measured by three-dimensional power Doppler ultrasound in the prediction of pregnancy during frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2006 Jun; 21(6), p. 1612–1617.
56. Niswender GD, Reimers TJ, Diekman MA and Nett TM. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol Reprod* 1976; 14, p. 64–81.
57. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000 Jan; 80(1), p. 1–29.
58. Nepomnaschy PA, Weinberg CR, Wilcox AJ, Baird DD. Urinary hCG patterns during the week following implantation. *Hum Reprod.* 2008 Feb; 23(2), p. 271–277.

59. Palomba S, Russo T, Falbo A, Orio F Jr, Manguso F, Nelaj E, Tolino A, Colao A, Dale B, Zullo F. Clinical use of the perifollicular vascularity assessment in IVF cycles: a pilot study. *Hum Reprod.* 2006 Apr; 21(4), p. 1055–1061.
60. Raga F, Bonilla-Musoles F, Casan EM, Klein O, Bonilla F. Assessment of endometrial volume by three-dimensional ultrasound prior to embryo transfer: clues to endometrial receptivity. *Hum Reprod.* 1999; 14(11), p. 2851–2854.
61. Raine-Fenning N and Fleischer AC. Clarifying the role of three-dimensional transvaginal sonography in reproductive medicine: an evidenced-based appraisal. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 2005 Aug 11; 2(10), p.1–18.
62. Robson SJ, Barry M, Norman RJ. Power Doppler assessment of follicle vascularity at the time of oocyte retrieval in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2008 Dec; 90(6), p. 2179–2182.
63. Rogers PA. Current studies on human implantation: a brief overview. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7(6), p.1395–1399.
64. Sahota DS, Leung TY, Fung TY, Chan LW, Law LW and Lau TK. Medians and correction factors for biochemical and ultrasound markers in Chinese women undergoing first-trimester screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33, p. 387–393.
65. Salat-Baroux J, Cornet D, Alvarez S, Antoine JM, Tibi C, Mandelbaum J, Plachot M. Pregnancies after replacement of frozen-thawed embryos in a donation program. *Fertil Steril.* 1988 May; 49(5), p. 817–821.
66. Salvesen KA and Lees C. Ultrasound is not unsound, but safety is an issue. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009 May; 33(5), p. 502–505.
67. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R, Suikkari AM. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen- thawed embryo transfer. *Hum Reprod.* 2003 Sep; 18(9), p.1890–1895.
68. Salumets A, Suikkari AM, Makinen S, Karro H, Roos A, Tuuri T. Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome. *Hum Reprod.* 2006 Sep; 21(9), p. 2368–2374.
68. Serafini P, Batzofin J, Nelson J, Olive D. Sonographic uterine predictors of pregnancy in women undergoing ovulation induction for assisted reproductive treatments. *Fertil Steril* 1994, 2(4), p. 815–822.
69. Serhal PF, Craft IL. Oocyte donation in 61 patients. *Lancet.* 1989 May 27; 1(8648), p. 1185–1187.
70. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program. *Fertil Steril.* 1993 May; 59(5), p. 1070–1074.

71. Skjoldebrand Sparre L, Carlstrom A, von Schoultz B and Carlstrom K. Serum levels of androgens and estrogens and 'steroid-sensitive' liver proteins in early human pregnancy: influence on the gender of the offspring. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 40, p. 145–150.
72. Spencer K, Ong CY, Liao AW and Nicolaides KH. The influence of parity and gravidity on first trimester markers of chromosomal abnormality. *Prenat Diagn* 2000a; 20(10), p. 792–794.
73. Spencer K, Ong CY, Liao AW, Papademetriou D and Nicolaides KH. The influence of fetal sex in screening for trisomy 21 by fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 2000b; 20(8), p. 673–675.
74. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Oct; 85(10), p. 3919–3924.
75. Salat-Baroux J, Cornet D, Alvarez S, Antoine JM, Tibi C, Mandelbaum J, Plachot M. Pregnancies after replacement of frozen-thawed embryos in a donation program. *Fertil Steril*. 1988 May; 49(5), p. 817–821.
76. Schild RL, Indefrei D, Eschweiler S, Ven H Van der, Fimmers R, Hansmann M. Three-dimensional endometrial volume calculation and pregnancy rate in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1999; 14(5), p. 1255–1258.
77. Tapanainen J, Kellokumpu-Lehtinen P, Pelliniemi L and Huhtaniemi I. Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52, p. 98–102.
78. Timor-Tritsch IE and Platt LD. Three-dimensional ultrasound experience in obstetrics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14, p. 556–575.
79. Tislaric D, Brajenovic-Milic B, Ristic S, Latin V, Zuvic-Butorac M, Bacic J, Petek M and Kapovic M. The influence of smoking and parity on serum markers for Down's syndrome screening. *Fetal Diagn Ther* 2002; 17, p. 17–21.
80. Trounson A, Leeton J, Besanko M, Wood C, Conti A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilised in vitro. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983 Mar 12; 286(6368), p. 835–838.
81. Tulchinsky D and Hobel CJ. Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. III. Early normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1973 Dec 1; 117(7), p. 884–893.
82. Tulchinsky D and Simmer HH. Sources of plasma 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35, p. 79–808.



83. Van Blerkom J, Antczak M and Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod.* 1997 May; 2(5), p. 1047–1055.
84. Van Steirteghem AC, Van der Elst J, Van den Abbeel E, Joris H, Camus M, Devroey P. Cryopreservation of supernumerary multicellular human Embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994; 62(4), p.775–7780.
85. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Vitrier S, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC. Selective transfer of cryopreserved human embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates. *Hum Reprod.* 1997; 12(7), p. 1513–1521.
86. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Meerssche M, Van de, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14(9), p.2345–2349.
87. Veleva Z, Tiitinen A, Vilska S, Hyden-Granskog C, Tomas C, Martikainen H, Tapanainen JS. High and low BMI increase the risk of miscarriage after IVF/ICSI and FET. *Hum Reprod.* 2008 Apr; 23(4), p. 878–884.
88. Wang JX, Yap YY, Matthews CD. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. *Hum Reprod.* 2001 Nov; 16(11), p. 2316–2319.
89. Wald NJ and Watt HC. Serum markers for Down's syndrome in relation to number of previous births and maternal age. *Prenat Diagn* 1996; 16, p. 699–703.
90. Wu J, Hellerstein S, Lipworth L, Wide L, Xu B, Yu GP, Kuper H, Lagiou P, Hankinson SE, Ekblom A, Carlström K, Trichopoulos D, Adami HO, Hsieh CC. Correlates of pregnancy oestrogen, progesterone and sex hormone-binding globulin in the USA and China. *Eur J Cancer Prev* 2002; 11, p. 283–293.
91. Yaron Y, Wolman I, Kupferminc MJ, Ochshorn Y, Many A and Orr-Urtreger A. Effect of fetal gender on first trimester markers and on Down syndrome screening. *Prenat Diagn* 2001; 21, p. 1027–1030.
92. Žáčková T, Šafář P, Krofta L, Řezáčová J, Mardešič T, Feyereisl J. Ultrazvuk v diagnostice primární a sekundární sterility (současné trendy ultrazvukového vyšetření v reprodukční medicíně). *Postgraduální medicína* 2009; 5, p. 423–429.

- 93.Žáčková T, Järvelä IY, Tapanainen JS, Feyereisl J. Assessment of endometrial and ovarian characteristics using three dimensional power Doppler ultrasound to predict response in frozen embryo transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009. Dec 25; 151(7), p. 1–8.

## 11. Přílohy

### 10. 1 Seznam publikací s tematikou vztahující se k dizertační práci

1. Assessment of endometrial and ovarian characteristics using three dimensional power Doppler ultrasound to predict response in frozen embryo transfer cycles. Žáčková T, Järvelä IY, Tapanainen JS, Feyereisl J. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Dec 25; 151(7), p. 1–8. **IF 2,63**
2. The effect of parity and fetal sex on placental and luteal hormones during early first trimester. Järvelä IY, Žáčková T, Laitinen P, Ryyänen M, Tekay A. *Prenatal Diagnosis*. 2012 Feb; 32(2), p.160-167. **IF 2,152**
3. The role of 3D ultrasound in assessment of endometrial receptivity and follicular vascularity to predict the quality oocyte. Žáčková T, Järvelä IY, Mardešič T. Chapter in book „Ultrasound imaging- Medical Applications“, edited by Igor Minin and Oleg Minin. 2011Aug . ISBN 978-953-307-279-1 In Tech, Open access Publisher
4. Ultrazvuk v diagnostice primární a sekundární sterility (současné trendy ultrazvukového vyšetření v reprodukční medicíně). Žáčková T, Šafář P, Krofta L, Řezáčová J, Mardešič T, Feyereisl J. *Postgraduální medicína* 2009; 5, p. 423–429.
5. Využití a význam 3D ultrasonografického vyšetření v asistované reprodukci Žáčková T, Mardešič T, Krofta L, Řezáčová J, Feyereisl J. *Čes. Gynek*. 2011, 76, č. 2. p. 128–134.

### 10. 2 Seznam dalších publikací bez vztahu k tématu dizertace

1. Outcomes of IVF and demographical aspects of sterility in the Czech Republic. T. Mardešič T, Žáčková T, Kučera T. *Sanguis* 2005; 35, p. 34–36.
2. Neplodnost a její příčiny, kapitola v Knize o těhotenství a porodu. Pařízek A et al. *Galen* 2005, p. 48–51.

## 10.3 Seznam posterových a ústních prezentací

- 1. Editorial Board Member OMICS Publishing Group - Journal of Fertilization : In Vitro- Open Access** jmenována v r. 2011/  
<http://www.omicsgroup.org/journals/editorialboardJFIV.php>
- 2. Using of 3D ultrasound in assisted reproduction.** Žáčková T, Krofta L, Mardešič T, Řezáčová J. Poster prezentace. Kongres SSG ČR a ČGPS ČLS JEP, Praha, květen 2007. Kniha abstraktů, p. 27.
- 3. Pregnancy and delivery in women with diagnosis Intestinal bowel disease.** Žáčková T, Pařízek A, Lukáš M, Donovan R, Komárek V. Congress SSG ČR a ČGPS JEP, Praha, květen 2007. Kniha abstraktů, p. 12.
- 4. Žáčková T, Krofta L, Mardešič T, Řezáčová J. Využití 3D UZ v asistované reprodukci.** 17. Symposium asistované reprodukce, Brno, 21.–22. 11. 2007, Sborník abstraktů, p. 258.
- 5. The role of three-dimensional ultrasonography in assisted reproduction.** Žáčková T, Krofta L, Mardešič T, Řezáčová J, Kalina J. The Second World Congress on Mild Approach in Assisted Reproduction, Embracing Mild IVF and IVM, ISMAAR 2008 London, UK, abstr. p. 34–35.
- 6. Žáčková T, Järvelä IY. Assessment of endometrial and ovarian characteristics using 3-D power Doppler ultrasound to predict response in frozen embryo transfer cycles,** ISUOG 2008, Chicago, USA, abstr. p. 266.
- 7. The role of three-dimensional ultrasonography in assisted reproduction.** Žáčková T, Krofta L, Mardešič T, Řezáčová J, Kalina J. 19. Symposium asistované reprodukce, Brno 12.–13. 11. 2009. Sborník abstrakt p. 218–219.
- 8. Assessment of endometrial and ovarian characteristics using three dimensional power Doppler ultrasound to predict response in frozen embryo transfer cycles.** Žáčková T, Järvelä IY, Tapanainen JS, Feyereisl J. The Third World Congress on Mild Approach in Assisted Reproduction, Embracing Mild IVF and IVM, ISMAAR 2010, Tokyo, Japan. abstr. p. 70.

9. Assessment of luteal Hormones and Ultrasound Ovarian Characteristics in Prediction of response to Assisted Reproduction Methods. Žáčková T. BIT s 1<sup>st</sup> Annual World Congress of Endobolism 2011, Xiamen, China. abstr.p. 62

## **10.4 Kopie publikovaných prací**